

**10/588685**

Verfahren zur Kalibrierung und Kontrolle von Methylierungsanalyse-Methoden mit Hilfe von nicht-methylierter

<sup>DNA</sup>  
**AP20 Rec'd PCT/PTO 07 AUG 2006**

5

### Hintergrund der Erfindung

Die vorliegende Erfindung betrifft die Verwendung von DNA, in der 5-Methylcytosin nicht auftritt. Solche nicht-methylierte DNA ist insbesondere als Kontrolle für eine verlässliche und sensitive Analyse von Cytosinmethylierungen erforderlich.

5-Methylcytosin ist die häufigste kovalent modifizierte Base in der DNA eukaryotischer Zellen. Sie spielt eine wichtige biologische Rolle, u.a. bei der Transkriptionsregulation, beim genetischen Imprinting und in der Tumorgenese (zur Übersicht: Millar et al.: Five not four: History and significance of the fifth base. In: The Epigenome, S. Beck and A. Olek (eds.), Wiley-VCH Verlag Weinheim 2003, S. 3-20). Die Identifizierung von 5-Methylcytosin als Bestandteil genetischer Information ist daher von erheblichen Interesse. Ein Nachweis der Methylierung ist allerdings schwierig, da Cytosin und 5-Methylcytosin das gleiche Basenpaarungsverhalten aufweisen. Viele der herkömmlichen, auf Hybridisierung beruhenden Nachweisverfahren vermögen daher nicht zwischen Cytosin und Methylcytosin zu unterscheiden. Zudem geht die Methylierungsinformation bei einer PCR-Amplifikation vollständig verloren.

Die herkömmlichen Methoden zur Methylierungsanalyse arbeiten im wesentlichen nach zwei unterschiedlichen Prin-

zipien. Zum einen werden methylierungsspezifische Restriktionsenzyme benutzt, zum anderen erfolgt eine selektive chemische Umwandlung von nicht-methylierten Cytosinen in Uracil (sog.: Bisulfit-Behandlung, siehe etwa: DE 101 54 317 A1; DE 100 29 915 A1). Die enzymatisch oder chemisch vorbehandelte DNA wird dann meist amplifiziert und kann auf unterschiedliche Weise analysiert werden (zur Übersicht: WO 02/072880 S. 1 ff). Von großem Interesse sind dabei Verfahren, die in der Lage sind, Methylierung sensitiv und quantitativ zu detektieren. Dies gilt aufgrund der wichtigen Rolle der Cytosin-Methylierung in der Krebsentstehung insbesondere in Hinblick auf diagnostische Anwendungen. Die herkömmlichen Verfahren gewährleisten eine sensitive und quantitative Methylierungsanalyse bisher nur beschränkt.

Zur sensitiven Analyse wird die chemisch vorbehandelte DNA üblicherweise mittels eines PCR-Verfahrens amplifiziert. Über die Verwendung methylierungsspezifischer Primer oder Blocker wird dann eine selektive Amplifikation nur der methylierten (bzw. bei umgekehrten Ansatz: unmethylierten) DNA gewährleistet. Der Einsatz methylierungsspezifischer Primer ist als sog. „methylierungsspezifische PCR“ bekannt („MSP“; Herman et al.: Methylation-specific PCR: a novel PCR assay for methylation status of CpG islands. Proc Natl Acad Sci U S A. 1996 Sep 3;93(18):9821-6). Hiermit gelingt vor allem der qualitative Nachweis von methylierter DNA geringer Konzentration. Ein vergleichbar sensitives Verfahren ist die sogenannte „HeavyMethyl“-Methode. Dabei wird eine spezifische Amplifizierung nur der ursprünglich methylierten (bzw. unmethylierten) DNA durch Einsatz von nicht-

methylierungsspezifischen Blocker-Oligomeren erreicht (also Blocker-Oligomere, die spezifisch an umgewandelte ehemals unmethylierte Nukleinsäuren hybridisieren; zur Übersicht: WO 02/072880; Cottrell et al.: A real-time PCR  
5 assay for DNA-methylation using methylation-specific blockers. Nucl. Acids. Res. 2004 32: e10). Sowohl MSP als auch HeavyMethyl sind als quantifizierbare „Real-Time-Varianten“ anwendbar. Diese ermöglichen es, den Methylierungsstatus von Positionen direkt im Verlauf der PCR  
10 nachzuweisen, ohne dass eine nachfolgende Analyse der Produkte erforderlich wäre („MethyLight“ - WO00/70090; US 6,331,393).

Eine verlässliche Quantifizierung des Methylierungsstatus  
15 über einen linearen Bereich ist mit den oben beschriebenen Verfahren bisher jedoch nur begrenzt möglich. Hierfür ist erforderlich, dass die Assays sowohl mit vollmethylierter wie auch mit nicht-methylierter DNA kalibriert werden (vgl.: Trinh et al.: DNA methylation analysis by  
20 MethyLight technology. Methods. 2001 Dec; 25(4): 456-62). Die Herstellung vollmethylierter DNA ist relativ einfach über die Verwendung der SssI-Methylase möglich. Dieses Enzym überführt im Sequenzkontext 5'-CG-3' alle nicht-methylierten Cytosine in 5-Methylcytosin. Problematisch ist  
25 allerdings die Herstellung von vollständig nicht-methylierter DNA. Denn ein der SssI-Methylase entsprechendes Enzym, das quantitativ alle Methylgruppen entfernt, steht nicht zur Verfügung. Bisher wird zur Kalibrierung Sperma-DNA verwandt, die über einen geringen Me-  
30 thylierungsgrad verfügt (vgl.: Trinh et al. 2001, a.a.o.). Jedoch ist die Sperma-DNA teilweise methyliert und eignet sich daher als verlässlicher Standard nur be-

dingt. Auch künstlich hergestellte, kurze unmethylierte Sequenzen wie PCR-Amplifikate sind nur begrenzt einsetzbar, etwa für die Analyse einzelner, definierter Positionen. Für Multiplex-Reaktionen können diese Standards nicht verwendet werden, da die Komplexität der Reaktion dann zu hoch wäre. Zudem erfordert die Entwicklung eines jeden neuen Nachweis-Assays die Herstellung eines neuen definierten Standards. Dagegen würde ein unmethylierter Standard, der die gesamte genomische DNA oder einen repräsentativen Teil hiervon abdeckt, eine zuverlässig quantifizierbare Methylierungsanalyse erlauben. Zudem wäre eine standardisierte und damit einfache, kostengünstige und schnelle Entwicklung neuer Nachweisassays möglich. Aufgrund der besonderen biologischen und medizinischen Bedeutung der Cytosin-Methylierung und aufgrund der oben erwähnten Nachteile der zur Zeit verwendeten Standards besteht ein großes technisches Bedürfnis an Methoden, die genomische DNA in vollständig nicht-methylierter Form zur Verfügung stellen. Im folgenden ist ein solches - überraschend einfaches - Verfahren beschrieben.

Erfindungsgemäß werden zur Herstellung nicht-methylierter DNA sogenannte genomweite Amplifikationsverfahren verwendet (WGA - whole genome amplification, zur Übersicht: Hawkins et al.: Whole genome amplification--applications and advances. Curr Opin Biotechnol. 2002 Feb; 13(1): 65-7). In diesen Verfahren wird ein großer Teil der genomischen DNA mittels einer DNA-Polymerase und „Random“- oder degenerierter Primer vervielfältigt. Unter „Random“ Primern sind solche Primer zu verstehen, die nicht spezifisch an bestimmte Nukleinsäuren, sondern an eine Vielzahl von Nukleinsäuren binden. Dazu gehören Primer die

entweder sehr kurz sind (zwischen 5 und 10 bp) oder Primer die als „degenerierte Primer“ bezeichnet werden. Unter degenerierten Primern sind solche Primer zu verstehen, die nicht spezifisch an bestimmte Nukleinsäuren binden, weil sie entweder Universalbasen enthalten, die an mehrere verschiedene Nukleotide binden oder aber es wird eine Mischung aus Primern verwendet, die sich jeweils in den „degenerierten“ Positionen unterscheiden. Unter Universalbasen versteht man Basen, die an mehrere verschiedene Nukleotide binden (siehe z.B. Katalog Promega : Pyrimidin- oder Purin- spezifische Universalbasen). Beides wird im folgenden als „degenerierter Primer“ verstanden. Dabei werden in den Amplifikationen nur nicht-methylierte Cytosintriphosphate angeboten, so dass die Amplifikate vollständig unmethyliert synthetisiert werden. Nach mehreren Amplifikationsrunden tritt die Menge der partiell methylierten Matrizen-DNA im Vergleich zu den neu hergestellten, nicht-methylierten Nukleinsäuren vollständig in den Hintergrund.

Bisher sind unterschiedliche WGA-Verfahren beschrieben. Bei der sog. Primer-Extensions-Präamplifikation (PEP: primer extension preamplification) wird die Amplifikation mittels einer Taq-Polymerase und einer zufälligen Mischung von Oligonukleotidprimern mit einer Länge von etwa 15 Nukleotiden durchgeführt (Zhang et al.: Whole genome amplification from a single cell: implications for genetic analysis. Proc Natl Acad Sci U S A. 1992 Jul 1; 89(13): 5847-51). Bei der DOP-PCR (degenerate oligonucleotide primed polymerase chain reaction) wird dagegen nur ein degenerierter Primer eingesetzt (vgl.: Telenius et al.: Degenerate oligonucleotide-primed PCR: general

amplification of target DNA by a single degenerate primer. Genomics. 1992 Jul; 13(3): 718-25). Ein weiteres WGA-Verfahren ist die sog. Linker-Adaptor-PCR. Dabei wird die DNA zunächst mittels eines Restriktionsenzym ver-

5     daut. Anschließend werden an die Restriktionsfragmente Linker ligiert. In der folgenden Amplifikation werden Primer eingesetzt, die spezifisch an die Linker binden (zur Übersicht: Cheung and Nelson: Whole genome amplifi-

10    cations using a degenerate oligonucleotide primer allows hundreds of genotypes to be performed on less than one nanogram of genomic DNA. Proc Natl Acad Sci U S A. 1996 Dec 10; 93(25): 14676-9 m.w.N.). Die oben beschriebenen, auf PCR-basierenden WGA-Verfahren haben allerdings mehrere Nachteile. So kann es etwa zur Generierung unspezifischer Amplifikationsartefakte kommen. Zudem erfolgt oft

15    nur eine unvollständige Abdeckung aller Genombereiche. Weiterhin entstehen teilweise nur kurze DNA-Fragmente mit einer Länge von weniger als 1 kB. (vgl.: Dean et al.: Comprehensive human genome amplification using multiple

20    displacement amplification. Proc Natl Acad Sci U S A. 2002 Apr 16; 99(8): 5261-6 m.w.N.). Das zur Zeit schlagkräftigste Verfahren zur genomweiten Amplifikation ist daher die isotherme "Multiple Displacement Amplification" (MDA, vgl.: Dean et al. 2002 a.a.o.; US Patent

25    6,124,120). Hierbei wird die genomische DNA mit „Random“-Primern und eine DNA-Polymerase umgesetzt. Es werden dabei Polymerasen eingesetzt, die in der Lage sind, den Nicht-Templat-Strang des DNA-Doppelstrangs während der Amplifikation zu verdrängen (etwa eine  $\phi$ 29 Polymerase).

30    Die verdrängten Stränge dienen wiederum als Matrize für die Extension weiterer Primer. Mit diesem Verfahren ist es möglich, aus nur 1-10 Kopien menschlicher genomischer

DNA etwa 20-30 µg DNA herzustellen. Dies entspricht einer mehr als 5000-fachen Amplifikation. Die durchschnittliche Produktlänge beträgt dabei mehr als 10 kB, wobei die Amplifikation relativ gleichmäßig über das gesamte Genom erfolgt. Die Reaktion kann direkt aus biologischen Proben erfolgen, etwa aus Blut oder Zellkulturen. Kommerzielle Kits zur MDA sind zur Zeit über zwei Anbieter verfügbar („GenomiPhi“ von Amersham Biosciences, [www4.amershambiosciences.com](http://www4.amershambiosciences.com); „Repli-g“ von Molecular Staging, [www.molecularstaging.com](http://www.molecularstaging.com)). Auch bereits amplifizierte DNA ist über diese Anbieter erhältlich. Die mittels MDA hergestellte DNA wird in vielfältigen Anwendungen eingesetzt, etwa im Genotyping von Einzelnukleotidpolymorphismen (SNP), im „Chromosomen-Painting“, in der Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus-Analyse, in der Subklonierung und in der DNA-Sequenzierung. Die MDA ist so insbesondere für genetische, forensische und diagnostische Untersuchungen verwendbar (vgl.: Dean et al. 2002, a.a.o.).

Die Verwendung von durch WGA-Methoden hergestellten DNA als Standard in Verfahren zum Nachweis von 5-Methylcytosin ist bisher noch nicht bekannt. Die im folgenden genauer beschriebenen Anwendungen eröffnen der Methylierungsanalyse daher erstmals Zugang zu genomischer, nicht-methylierter DNA. Aufgrund der besonderen Bedeutung der Cytosinmethylierung und aufgrund der beschriebenen Nachteile des Standes der Technik stellt das Eröffnen dieser vorteilhaften, neuen Technologie einen wichtigen technischen Fortschritt dar.

Ein weiterer Aspekt der Erfindung besteht in der Verwendung von Kalibrierungsstandards, die unmethylierte DNA enthalten, für Verfahren zur Methylierungsanalyse, die auf Verwendung von Mikroarrays basieren, welche dadurch gekennzeichnet sind, dass an ihnen Detektionsoligomere immobilisiert sind. Erfindungsgemäß ist demnach ein auf Mikroarraybenutzung basierendes Verfahren zur Bestimmung des Methylierungsgrades von DNA unter Verwendung von Kalibrierungsstandards, die einerseits unmethylierte DNA und andererseits spezifisch aufmethylierte DNA enthalten. Wobei „spezifisch aufmethylierte“ DNA solche DNA bezeichnet, die zu einem bekannten Grad methyliert ist, also eine bekannte Methylierungsrate aufweist. Dieses Verfahren ist dadurch gekennzeichnet, dass anhand der Hybridisierungswerte, die in einem mehrstufigen Prozeß, um ihr Rauschen korrigiert, normalisiert und varianzstabilisiert werden, anhand einer berechneten Kalibrierungskurve absolute Werte über die Methylierungsrate erhalten werden können.

Als Quelle solcher DNA kann z.B. Spermien-DNA genommen werden. Da diese aber nicht vollständig unmethyliert ist, ist es bevorzugt hierfür die bereits beschriebene genomische nicht-methylierte DNA zu verwenden. Besonders bevorzugt ist hierbei die Verwendung der nach den beschriebenen Verfahren hergestellten genomischen nicht-methylierten DNA als Kalibrierungsstandard. Für diesen erfinderischen Aspekt ist es jedoch auch denkbar für die Kalibrierung nicht-methylierte DNA aus anderen Quellen zu verwenden, solange sie nachgewiesenermaßen unmethyliert ist (z.B. Spermien DNA).



Methoden zur Analyse von Mikroarray-Experimenten, in denen Oligonukleotide zur Detektion von Nukleinsäuren, wie beispielsweise mRNA oder ESTs, oder eben Amplifikate auf einer Oberfläche immobilisiert werden, sind beschrieben.

5 Ein Problem der Analyse von Genexpressions-Mikroarraydaten besteht darin, daß die Variation der Expression unter konstanten Bedingungen von Gen zu Gen nicht konstant ist. (David M. Rocke (2003) Heterogeneity of Variance in Gene Expression Microarray Data. Dieser Artikel ist als Vorabdruck (preprint) erhältlich auf  
10 <http://www.cipic.ucdavis.edu/~dmrocke/preprints.html> datiert: March 15, 2003).

Ein weiteres Problem ergibt sich jedoch aus der Unvergleichbarkeit von Expressions-Mikroarraydaten aus verschiedenen Mikroarray-Experimenten, weil sich diese nur sehr schwer kalibrieren lassen. Der Ansatz sogenannte „housekeeping“ genes als Positivkontrollen zu verwenden, erlaubt zwar eine Aussage darüber, ob eine Hybridisierung  
15 tatsächlich erfolgt ist (getestet wird somit nur, ob die Hybridisierungsbedingungen ausreichend waren, um eine Hybridisierung des Analyts zu erlauben), aber eine absolute Quantifizierbarkeit der Expressionsdaten ist damit nicht möglich. Das liegt zum einen daran, daß nicht klar definiert ist, welches Gen unter welchen Bedingungen ein  
20 „housekeeping-Gen“ darstellt und zum anderen daran, daß es nicht möglich ist, eine bestimmte Menge bekannter DNA zuzugeben, und damit einen absoluten Wert (zum Kalibrieren) zu generieren, weil man dazu im Voraus wissen  
25 müßte, wieviele der in der zu untersuchenden Probe vorhandenen Nukleinsäuren tatsächlich an Detektionsoligomer A binden würde, die entsprechende Menge bekannter Zusatz-

30

DNA entspräche dann einer Signalintensität von 100% für genau jenes Detektionsoligomers. In anderen Worten, es ist nicht klar, wieviel Test-DNA bekannter Sequenz (Standard) man einem Experiment zugeben müßte, um einen zum  
5 Kalibrieren nötigen Wert (eben entsprechend einem bestimmten definierten Anteil) zu generieren. Daher sind Expressionsstudien immer auf die Angabe relativer Aussagen limitiert. Es läßt sich auch nicht bestimmen, wie groß der Anteil der in der Probe exprimierten mRNA ist,  
10 die mit einem bestimmten Oligomer, z.B. Oligo X, hybridisiert, weil die Gesamtheit der Signale nicht der Gesamtheit der enthaltenen mRNAs entsprechen muß.

Bei der hier erwähnten Mikroarray-Methylierungsanalyse  
15 (siehe auch Adorjan et al.: Tumour class prediction and discovery by microarray-based DNA methylation analysis. Nucleic Acids Res. 2002 Mar 1; 30(5): e21) sind Oligomere zur Detektion von methylierten (CG-Oligos) und /oder un-methylierten (TG-Oligos) CpG Positionen immobilisiert.  
20 Oft werden dedizierte Paare von CG- und TG-Oligos benutzt und ins Verhältnis gesetzt um einen Methylierungsindex zu berechnen. Adorjan et al benutzen  $\log(CG/TG)$ , Gitan et al. (Gitan et al. (2002) Methylation specific oligonucleotide microarray: a new potential for highthroughput me-  
25 thylation analysis. Genome Res., 12, 158-164) benutzen  $\log(CG)/(\log(CG)+\log(TG))$ . Somit erhält man Abschätzungen darüber welche CpG Position welcher Probe mehr oder weniger stark methyliert vorliegt. Um statistisch signifikante Marker zu finden reicht diese Methode aus. Eigentlich  
30 will man aber echte Methylierungsraten bestimmen, also absolute Werte ermitteln. Dies ist insbesondere wichtig für die anschließende Wahl der Detektionsmethode, für das

sogenannte Assay-Format, insbesondere zur Analyse von Proben, die nur wenig DNA beinhalten. Bei den dann zur Anwendung kommenden sogenannten „sensitive detection“ Verfahren ist es von Bedeutung ob ein niedriger Wert einer 0-5% Methylierungsrate oder einer 15%-20% Methylierungsrate entspricht.

Bei den genannten Mikroarrays, weiß man, welche Nukleinsäuren (Amplifikate) in der zu hybridisierenden Probe enthalten sind (nur nicht, ob diese ein C oder ein G in der Abfrageposition tragen), und es gibt nur zwei Zustände in denen sie sich unterscheiden können, so daß die Gesamtheit der Signale eines CG- und eines TG-Detektionsoligos konstant ist.

Das in einem Erfindungsaspekt hierin vorgestellte Verfahren zur Kalibrierung von diesen Mikroarray-Chips hat den Vorteil, erstmalig Zugang zu absoluten Angaben über das Ausmaß der Methylierung bzw. den Grad der Methylierung (level of methylation) zu untersuchender Amplifikate machen zu können.

Sie ist insbesondere geeignet zur Methylierungsanalyse, die dadurch gekennzeichnet ist, daß Mikroarrays verwendet werden, an die pro Abfrageposition im zu detektierenden Amplifikat mindestens zwei Oligonukleotide immobilisiert sind. Außerdem ist sie dadurch gekennzeichnet, daß die gegen die Oligonukleotide zu hybridisierenden Nukleinsäuren (Amplifikate) in ihrer Sequenz an sich bekannt sind, mit Ausnahme von 1 bis drei Abfragepositionen, die aber ihrerseits nur in zwei verschiedenen Varianten auftauchen können. Diese zwei Detektionsoligos unterscheiden sich dadurch, daß sie in der Abfrageposition entweder ein Cytosin oder ein Thymin aufweisen, analog, bei der Analy-

se des Gegenstranges, entweder ein Guanin oder ein Adenin aufweisen.

Es ist bekannt, daß Hybridisierungsdaten von Mikroarray-Hybridisierungen zunächst hintergrund-korrigiert und dann normalisiert werden, ebenso ist es bekannt, daß diese Daten umgewandelt werden, was als Datentransformation bezeichnet wird, um damit eine Varianzstabilisierung zu erreichen. Varianzstabilisierte Daten sind damit üblichen statistischen Auswertungen zugänglich. Der aktuelle Stand der Forschung auf diesem Gebiet läßt sich zum Beispiel den verschiedenen Arbeiten von Durbin und Rocke oder den anderen hierin aufgeführten Artikeln entnehmen:

- Rocke DM und Lorenzato S (1995), A two-component model for measurement error in analytical chemistry, *Technometrics*. **37**, 176-184;
- Durbin BP et al. (2002), A variance stabilizing transformation for gene-expression microarray data. *Bioinformatics*. **18**(1), 105-110;
- Geller SC et al. (2003), Transformation and Normalization of oligonucleotide microarray data. *Bioinformatics*, **19**(14), 1817-1823;
- Durbin BP and Rocke DR (2003), Estimation of transformation parameters for microarray data. *Bioinformatics*, **19**(11), 1360-1367;
- Durbin BP and Rocke MR (2003), Approximate variance-stabilizing transformations for gene-expression microarray data, *Bioinformatics*, **19**(8), 966-972;
- Durbin BP and Rocke MR (2004), Variance-stabilizing transformations for two-color microarrays, *Bioinformatics*, **20**(5), 660-667.

Ein weiterer Aspekt der Erfindung ist hingegen der Schritt der Kalibrierung der Mikroarraydaten unter Verwendung unmethylierter und damit auch -nun zugänglich gewordener- zu definierten Anteilen -also spezifisch- auf-

5 methylierter DNA, wie im Folgenden näher beschrieben.

### Beschreibung

Erfindungsgemäß wird die durch genomweite Amplifizierungsverfahren hergestellte DNA als Standard in der Methylierungsanalyse verwendet. Erfindungsgemäß ist weiterhin ein Verfahren zur Methylierungsanalyse, das dadurch gekennzeichnet ist, dass

10

- a) eine genomweite Amplifikation durchgeführt wird,
- 15 b) die daraus hervorgegangenen Amplifikate in der Methylierungsanalyse als Standard verwendet werden.

Prinzipiell können erfindungsgemäß alle oben beschriebenen WGA-Verfahren eingesetzt werden. Die Reaktionsbedingungen der PEP, DOP-PCR und Linker-PCR gehören zum Stand der Technik (s.o.). Aufgrund der oben beschriebenen Nachteile der auf PCR basierenden WGA-Verfahren wird erfindungsgemäß bevorzugt eine MDA durchgeführt. Auch die Reaktionsbedingungen für ein MDA-Verfahren sind hinreichend

20 bekannt (vgl.: Dean et al 2002, a.a.o.; US-Patente 6,124,120; 6,280,949; 6,642,034; US-Anmeldung 20030143536; Produktinformationen zu den oben erwähnten Genomiphi und Repli-g-Kits). Auch andere Variationen der WGA, insbesondere des MDA-Verfahrens, können erfindungsgemäß zur Herstellung nicht-methylierter DNA verwendet

25 werden. So ist es etwa möglich, die DNA zunächst zu fragmentieren und an die Fragmente Linker zu ligieren. An-

30

schließlich werden die Fragmente in Concatamere überführt, die dann über eine MDA amplifiziert werden (multiple strand displacement amplification of concatenated DNA - MDA-CA ; vgl.: US 6,124,120).

5

Erfindungsgemäß bevorzugt wird jedoch eine herkömmliche MDA benutzt. Vorzugsweise werden zwei Sets von Primern verwendet. Jeweils ein Primerset ist komplementär zu einem Strang der zu amplifizierenden DNA. Bei den Primer-

10 sets kann es sich um Random-Primer oder degenerierte Primer handeln. Einzelheiten zur Anzahl, Länge und zur Struktur der Primer sind vielfach beschrieben (vgl.: US 6,124,120). So ist etwa bekannt, dass Primer verwendet werden können, die am 5'-Ende nicht komplementär zu der

15 Zielsequenz sind. Hiermit wird die Verdrängung der Primer durch die Polymerase erleichtert. Die 5'-Region der Primer kann zudem funktionale Sequenzen, etwa für einen Promotor tragen (vgl.: US 6,124,120). Der optimale Aufbau der Primer hängt von der Art der verwendeten Polymerase

20 ab, insbesondere von ihrer Prozessivität (vgl.: US 6,124,120). Besonders bevorzugt werden Hexamer-Primer benutzt. Verschiedene Polymerasen sind in der MDA-Reaktion einsetzbar. Die Enzyme müssen entweder alleine oder in Kombination mit Hilfsfaktoren (etwa Helikasen) in der La-

25 ge sein, während der Replikation den Nicht-Matrizenstrand der zu replizierenden DNA-Doppelhelix zu verdrängen. Dabei werden bevorzugt Polymerasen eingesetzt, die über keine 5'-3'-Exonuklease-Aktivität verfügen. Alternativ können allerdings auch Primer eingesetzt werden, die am

30 5'Ende blockiert und daher von den Polymerasen nicht degradierbar sind. Als Polymerase wird besonders bevorzugt die  $\phi$ 29-Polymerase verwendet. Diese verfügt über eine

sehr hohe Prozessivität, die es ihr erlaubt, sehr effektiv DNA zu synthetisieren, auch wenn extreme Basenzusammensetzungen, kurze Tandemwiederholungen (short tandem repeats) oder Sekundärstrukturen in der DNA auftreten. In dem US-Patent 6,124,120 und in der US-Patenanmeldung 2003/0143536 A1 sind weitere einsetzbare Polymerasen aufgeführt, etwa Bst, Bca oder Phage M2-DNA-Polymerase. Die für die Amplifikation erforderlichen Reaktionsbedingungen sind von der Auswahl der Polymerasen und der Primer abhängig und ergeben sich ebenfalls aus den oben genannten Referenzen. Es ist u.a. auch bekannt, dass über unterschiedliche Methoden eine Detektion und Quantifizierung der amplifizierten DNA erreicht werden kann, etwa über den Einbau markierter Nukleotide, über Verwendung besonderer Detektionssonden oder über Festphasendetektoren (Vgl.: 6,124,120).

In einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung werden die kommerziell erhältlichen Kits zur Synthese der nicht-methylierten DNA verwendet. Besonders bevorzugt werden die Kits „GenomiPhi“ (Amersham Biosciences) oder „Repli-g“ (Molecular Staging) verwendet. Die Amplifikation erfolgt dabei nach Herstellerangaben. Im wesentlichen wird dabei die zu amplifizierende DNA mit einem Probenpuffer und Random Hexamer Primern versetzt. Die Mischung wird hitzedenaturiert und anschließend gekühlt, so dass es zu einer Bindung der Primer an die DNA kommen kann. Danach werden die verbleibenden Reaktionskomponenten, insbesondere die Desoxynukleosidtriphosphate und die  $\phi$ 29-Polymerase hinzugefügt. Die Reaktionsmischung wird dann für etwa 30 Stunden bei 30°C inkubiert. Als Ausgangsmaterial kann etwa DNA verwandt werden, die über die kommer-

ziell verfügbaren Aufreinigungsmethoden isoliert wurde. Für zelluläre Proben wie Blutproben oder Primärzellen aus klinischen Proben kann auch eine alkalische Lyse mit nachfolgender Neutralisation ausreichend sein (vgl.: Produktinformation von Amersham zum GenomiPhi-DNA-Amplifikationskit).

In einer besonders bevorzugten Ausführungsform der Erfindung wird als Standard kommerziell erhältliche, über MDA hergestellte DNA verwendet (s.o.). Dies hat den Vorteil, dass die DNA aufgrund der standardisierten Herstellungsprozesse von gleichbleibender Konzentration und Qualität ist.

Die über die oben beschriebenen Verfahren hergestellte oder käuflich erworbene DNA kann in einer Vielzahl von Methylierungsanalyseverfahren als Standard verwendet werden. Hierzu gehören sowohl Verfahren, die auf dem Einsatz von Restriktionsenzymen beruhen, wie auch Verfahren, die auf einer Bisulfitbehandlung der DNA basieren (vgl.: Fraga and Esteller: DNA Methylation: A Profile of Methods and Applications. Biotechniques 33:632-649, September 2002). Bevorzugt wird zunächst eine Bisulfitumwandlung durchgeführt. Die Bisulfitumwandlung ist dem Fachmann in unterschiedlichen Variationen bekannt (siehe etwa: Frommer et al.: A genomic sequencing protocol that yields a positive display of 5-methylcytosine residues in individual DNA strands. Proc Natl Acad Sci U S A. 1992 Mar 1;89(5):1827-31; Olek, A modified and improved method for bisulphite based cytosine methylation analysis. Nucleic Acids Res. 1996 Dec 15;24(24):5064-6.; DE 100 29 915; DE 100 29 915). Besonders bevorzugt erfolgt die Bisulfitum-



wandlung in Gegenwart von denaturierenden Lösemitteln, etwa Dioxan, und eines Radikalfängers (vgl.: DE 100 29 915). In einer anderen bevorzugten Ausführungsform wird die DNA nicht chemisch, sondern enzymatisch umgewandelt.

5 Dies ist etwa durch Einsatz von Cytidin-Deaminasen denkbar, die unmethylierte Cytidine schneller umsetzen als methylierte Cytidine. Ein entsprechendes Enzym ist kürzlich identifiziert worden (Bransteitter et al.: Activation-induced cytidine deaminase deaminates deoxycytidine on

10 single-stranded DNA but requires the action of RNase. Proc Natl Acad Sci U S A. 2003 Apr 1;100(7):4102-7).

Die umgewandelte DNA kann anhand gängiger molekularbiologischer Verfahren analysiert werden, etwa über Hybridisierung oder Sequenzierung. In einer bevorzugten Variante

15 wird die umgewandelte DNA zunächst amplifiziert. Hierzu sind dem Fachmann unterschiedliche Verfahren bekannt, etwa Ligasekettenreaktionen. Vorzugsweise wird die DNA allerdings über eine Polymerasereaktion amplifiziert. Hierzu

20 sind verschiedene Ausgestaltungen denkbar, etwa die Verwendung isothermer Amplifikationsverfahren. Besonders bevorzugt sind allerdings Polymerasekettenreaktionen (PCR). In einer ganz besonders bevorzugten Ausführungsform erfolgt die PCR unter Verwendung von Primern, die

25 spezifisch nur an Positionen der umgewandelten Sequenz binden, die vorher entweder methyliert oder (bei umgekehrtem Ansatz) unmethyliert) waren (MSP, s.o.). In einer anderen ganz besonders bevorzugten Ausführungsform wird die umgewandelte DNA mit Hilfe von methylierungs- bzw.

30 un-methylierungs-spezifischen Blockern analysiert („HeavyMethyl“-Methode, s.o.). Die Detektion der PCR-Amplifikate kann über herkömmliche Verfahren erfolgen,

etwa über Methoden der Längenmessung wie Gelelektrophorese, Kapillargelelektrophorese und Chromatographie (z.B. HPLC). Auch Massenspektrometrie und Methoden zur Sequenzierung wie die Sanger-Methode, die Maxam-Gilbert-Methode und Sequencing by Hybridisation (SBH) können verwendet werden. In einer bevorzugten Ausführungsform werden die Amplifikate durch Primer-Extension-Verfahren nachgewiesen oder durch methylierungsspezifische Ligationsverfahren (siehe etwa: Gonzalgo & Jones: Rapid quantitation of methylation differences at specific sites using methylation-sensitive single nucleotide primer extension (Ms-SNuPE). Nucleic Acids Res. 1997 Jun 15;25(12):2529-31; DE 100 10 282; DE 100 10 280). In einer anderen bevorzugten Ausführungsform werden die Amplifikate mittels Hybridisierung an Oligomer-Mikroarrays analysiert (vgl.: Adorjan et al.: Tumour class prediction and discovery by microarray-based DNA methylation analysis. Nucleic Acids Res. 2002 Mar 1; 30(5): e21). In einer weiteren besonders bevorzugten Ausführungsform werden die Amplifikate unter Verwendung von PCR-Real-Time-Varianten analysiert (vgl.: Heid et al.: Real time quantitative PCR. Genome Res. 1996 Oct;6(10):986-94, US Patent No. 6,331,393 „MethyLight“). Dabei wird die Amplifikation in Gegenwart eines methylierungsspezifischen, fluoreszenzmarkierten Reporteroligonukleotids durchgeführt. Das Reporteroligonukleotid bindet dann bevorzugt an die zu untersuchende DNA und zeigt deren Amplifikation durch Zunahme oder Abnahme der Fluoreszenz an. Dabei ist es besonders vorteilhaft, wenn die Fluoreszenzveränderung direkt zur Analyse benutzt wird und aus dem Fluoreszenzsignal auf einen Methylierungszustand geschlossen wird. Eine besonders bevorzugte Variante ist dabei das „Taqman“-Verfahren. In einer anderen be-

sonders bevorzugten Ausführungsform wird ein zusätzliches fluoreszenzmarkiertes Oligomer verwendet, das in unmittelbarer Nähe zu dem ersten Reporteroligonukleotid hybridisiert und sich diese Hybridisierung mittels Fluoreszenz-Resonanz-Energietransfer nachweisen läßt („Lightcycler“-Verfahren).

Eine bevorzugte Ausführungsform der Erfindung ist es, mehrere Fragmente gleichzeitig mittels einer Multiplex-PCR zu amplifizieren. Bei deren Design muss darauf geachtet werden, daß nicht nur die Primer, sondern auch die weiteren eingesetzten Oligonukleotide nicht zueinander komplementär sein dürfen, so daß eine hochgradige Multiplexierung in diesem Fall schwieriger ist als üblich. Erschwerend ist hierbei auch, daß die Bisulfit-bedingte Konversion der Nukleinsäuren deren Komplexität herabsetzt. Jedoch hat man bei der chemisch vorbehandelten DNA den Vorteil, daß aufgrund des unterschiedlichen G- und C-Gehaltes der beiden DNA-Stränge ein Forward-Primer niemals auch als Reverse-Primer fungieren kann, was die Multiplexierung wiederum erleichtert und den oben beschriebenen Nachteil im wesentlichen ausgleicht. Die Detektion der Amplifikate ist wiederum über unterschiedliche Verfahren möglich. Denkbar ist dabei etwa die Verwendung von Real-Time-Varianten. Für Amplifikationen von mehr als vier Genen empfiehlt es sich aber, die Amplifikate auf andere Weise zu detektieren. Bevorzugt ist dabei eine Analyse über Mikroarrays (s.o.).

Eine aktuelle Übersicht über weitere mögliche Methoden zur Methylierungsanalyse findet sich in: Fraga and Esteller 2002, a.a.o.).

In den unterschiedlichen Methoden zur Methylierungsanalyse kann die MDA-DNA auf unterschiedliche Weise als Standard eingesetzt werden. Unter Standard ist dabei zum einen jegliche Art der Negativkontrolle oder Positivkontrolle im Falle des Nachweises von nicht-methylierter DNA zu verstehen. Dies ist insbesondere bei Technologien der Fall, die kleinste Mengen methylierter DNA in einem großen Hintergrund von nicht-methylierter DNA nachweisen und umgekehrt. Dieser Fall wird auch als sogenannte „sensitive detection“ bezeichnet. Hier dient die unmethylierte MDA-DNA während der Assay-Entwicklung als Kontrolle der Spezifität des Assays für methylierte DNA und in der Anwendung des Assays als Negativkontrolle. Erfindungsgemäß bevorzugt ist aber auch, ein Gemisch aus nicht-methylierter DNA und methylierter DNA zu verwenden. Besonders bevorzugt ist es, unterschiedliche Gemische (also bestehend aus unterschiedlichen Anteilen) aus nicht-methylierter und methylierter DNA zu verwenden. Hiermit können dann Kalibrierungskurven erstellt werden. Um diese Gemische herzustellen, verwendet man als Basis bevorzugt die durch MDA hergestellte unmethylierte DNA. Diese Gesamtmenge der Kontroll-DNA wird geteilt und ein Teil davon mittels einer Sss1-Methylase methyliert (s.o.). Dabei wird der andere Teil der nicht-methylierten DNA ebenfalls mit allen Reaktionskomponenten des Methylierungsansatzes bis auf die Methylase umgesetzt. So ist sichergestellt, dass die DNA-Konzentration in beiden Ansätzen identisch ist, und in beiden Ansätzen die gleichen Reaktionskomponenten anwesend sind. Anschließend werden nicht-methylierte und methylierte DNA in unterschiedlichen Verhältnissen gemischt, etwa im Verhältnis 4:0 für

0%, 3:1 für 25%, 2:2 für 50%, 1:3 für 75%, 0:4 für 100%. Für die Entwicklung von Assays für die sensitive Detektion kann es bevorzugt sein, Mischungen mit sehr geringen Konzentrationen an methylierter DNA (etwa 1: 2000-  
5 1:10000) herzustellen.

Indem der Quotient der Signale, die für den methylierten Zustand detektiert werden, und der Signale, die für den unmethylierten Zustand detektiert werden, gebildet wird,  
10 erhält man die gemessene Methylierungsrate. Trägt man diese gegen die theoretischen Methylierungsraten (entsprechend dem Anteil methylierter DNA in den definierten Mischungen) auf und ermittelt die Regression, die durch die Messpunkte geht, erhält man eine Kalibrierungskurve. An-  
15 hand dieser Kalibrierungskurve lässt sich über die gemessene Methylierungsrate der Methylierungsgrad der unbekannten Proben bestimmen.

Für Assays die Methylierung über Hybridisierung einer fluoreszierenden Meßsonde quantifizieren (Mikroarrays, MethyLight, andere Hybridisierungsassays in Lösung) ist  
20 das gemessene Fluoreszenzsignal über einen weiten Bereich linear von der Konzentration methylierter DNA (wenn die Sonde spezifisch an -vor der Umwandlung- methylierte Nukleinsäuren hybridisiert) abhängig, (JG Wetmur, Hybridization and renaturation kinetics of nucleic acids, Annual Reviews, 1976). Diese Assays können daher kalibriert werden, indem lediglich die unspezifische Hintergrundhybridisierung **und** der dynamische Bereich der Meßsonden be-  
25 stimmt wird. Dies kann mit Hilfe von künstlich hergestellter unmethylierter und methylierter DNA geschehen.  
30 Die eigentliche Methylierungsrate kann dann durch einfache lineare Interpolation zwischen der Fluoreszenzinten-

5     sität der unmethylierten DNA (0% Methylierung) und der  
Fluoreszenzintensität der methylierten DNA (100% Methy-  
lierung) bestimmt werden. Es ist besonders bevorzugt,  
dass diese Bestimmung der Methylierungsrate einer gegebe-  
nen Probe (sample) aus mehreren wiederholten Messungen  
erfolgt und die statistische Verteilung des Messrauschens  
berücksichtigt wird (DM Rocke and S Lorenzato, A two-  
component model for measurement error in analytical che-  
mistry, Technometrics, 1995, 37, 176-184). Dies wird be-  
vorzugt mit Hilfe klassischer statistischer Verfahren wie  
10     der „Maximum Likelihood“ oder „Varianzstabilisierung“  
realisiert.

Im Folgenden wird dieses besonders bevorzugte  
15     erfindungsgemäße Verfahren zur Umwandlung von  
Signalintensitäten aus Methylierungs-Mikroarray-  
Hybridisierungsexperimenten beschrieben. Die Durchführung  
solcher methylierungsspezifischen Mikroarray-  
Hybridisierungsexperimente wurde bereits anderweitig  
20     ausführlich beschrieben zum Beispiel von Adorjan et al.  
(Nucleic Acids Res. 2002 Mar 1;30(5):e21). Die Umwandlung  
der Signalintensitäten in Methylierungswerte jedoch,  
erfolgt bei Adorjan et al. nach einem anderen Verfahren.  
Das neue Verfahren ist charakterisiert durch die  
25     Verwendung von erfindungsgemäß unmethylierter DNA in  
einem wesentlichen Schritt, nämlich der Kalibrierung der  
zuvor vom Hintergrund-Rauschen korrigierten,  
normalisierten und varianzstabilisierten  
Hybridisierungsdaten, wie sie insbesondere bei der  
30     Methylierungsanalyse mit sogenannten CG- und TG-Oligos  
vorkommen. Erst die durch die Verwendung unmethylierter  
DNA ermöglichte Kalibrierung erlaubt letztlich die

akkurate Zuordnung von Methylierungs-Signalen, die sich aus Signalintensitäten berechnen lassen, in tatsächliche Methylierungsraten.

Es ist also ein weiterer erfindungsgemäßer Aspekt, ein  
5 Verfahren bereitzustellen, dass dadurch gekennzeichnet ist, dass es Kalibrierungsstandards zur Auswertung der Hybridisierungsdaten aus Mikroarray-Versuchen benutzt, wobei ein Standard keine methylierte DNA enthält, und der andere Standard DNA eines definierten Grades an  
10 Methylierung (z.B. 100%) enthält, um dadurch tatsächliche Methylierungsraten zu bestimmen. Der methylierte Standard wird bevorzugt wie oben beschrieben durch Aufmethylierung mit der Sss1-Methylase hergestellt. Zur Verwendung als Standard, der keine methylierte DNA enthält, wird  
15 bevorzugt unmethylierte DNA verwendet. Besonders bevorzugt ist hierbei die Verwendung von nach dem oben beschriebenen Verfahren hergestellter genomischer unmethylierter DNA.

Bevorzugt, aber nicht unbedingt notwendig für die  
20 Erstellung einer Kalibrierungskurve, ist die Verwendung mehrerer zu unterschiedlichen Graden methylierter DNA.

Besonders bevorzugt ist jedoch ein Verfahren dass es erlaubt eine akkurate Zuordnung der absoluten Werte anhand einer Kalibrierungskurve zu ermitteln, die unter  
25 Zuhilfenahme nur zweier Kalibrierungsstandards (besonders bevorzugt sind hierbei 0% und 100%) berechnet wurde.

Hierbei bezeichnet die Methylierungsrate einen Wert von 0 bis 100, der das Verhältnis der Anteile der tatsächlich  
30 methylierten DNA und der unmethylierten DNA zueinander in der analysierten Probe (sample) pro Oligonukleotidsonden-

Paar (oder pro Abfrageposition (= CpG oder TpG), falls das Oligo nur eine CpG-Site abdeckt) angibt.

Erfindungsgemäß werden die Kalibrierungsstandards benutzt, um eine Kalibrierungskurve zu erstellen, anhand derer -wie im Folgenden näher erläutert- die tatsächlichen Methylierungsraten der untersuchten Proben abgelesen werden können. Erfindungsgemäß ist demnach das konkrete Verfahren der Umwandlung der erhaltenen Hybridisierungswerte in absolute Methylierungsraten. Dies wird im Folgenden näher erläutert.

Bevor die Methylierungsdaten eines Methylierungsexperiments (basierend auf Mikroarrays) überhaupt kalibriert werden können, müssen die rohen PIXEL Intensitäts-Angaben der Mikroarray-Laser-Scan-Abbildungen für jedes Oligonukleotidsonden-Paar in Methylierungssignalwerte überführt werden. Die rohen Meßdaten einzelner Oligonukleotid-Spotting-Positionen müssen also in Methylierungs-Signale (*methylation signal*) pro Oligonukleotidsonden-Paar (bzw. pro Abfrageposition) der Detektions-Sonden umgewandelt werden. Eine Abfrageposition ist immer jeweils das zu untersuchende Cytosin (oder Thymin) vor einem Guanin (innerhalb eines CpG Dinukleotids). Da Detektions-Oligonukleotidsonden aber auch mehrere solcher CpG-Stellen enthalten können, werden Methylierungssignale im Weiteren pro Oligonukleotidsonden-Paar angegeben und nicht pro Abfrageposition.

Das erfindungsgemäße Auswerteverfahren sei im Folgenden näher erläutert:

Der erste Schritt ist die Korrektur um das Hintergrundrauschen (background correction): Für jeden



Spot, also jedes lokalisierte Detektionsoligo, wird der Median der Hintergrundpixel-Intensitäten vom Median der Vordergrundpixel-Intensitäten subtrahiert. Das ergibt eine robuste Abschätzung der Hintergrund-korrigierten Oligonukleotid-Hybridisierungsintensitäten. Dies kann zum Beispiel aber auch über die Verwendung der Formel :  $X = I_{\text{meth}} - r^2$  geschehen.

Der zweite Schritt kann als Daten-Normalisierung (normalization of data) bezeichnet werden: Hierzu werden generell klassische Methoden benutzt, die allerdings für die Anwendung auf Methylierungs-Mikroarray-Experimente optimiert werden können, indem von der Annahme ausgegangen wird, daß die Summe der CG-Signale und der TG-Signale innerhalb einer Probe, konstant ist, und zwar über mehrere Mikroarrays hinweg, oder auch nur über mehrere Amplifikate innerhalb eines Mikroarrays hinweg. Dies ist der inhärente Vorteil der Methylierungsanalyse mit CG- und TG-Oligosonden, wie bereits anderweitig beschrieben. Die hintergrund-korrigierten redundanten CG- und TG-Detektionsoligo-Spot-Intensitäten jedes Mikroarrays werden linear skaliert, so daß die Gesamtverteilung der Intensitäten jedes Mikroarrays möglichst identisch sind (einfachster Fall: Median der CG+TG Intensitäten ist identisch für alle Mikroarrays). Die Intensitäten sind bevorzugt redundant, was bedeutet, daß sich auf einem Mikroarray Spots (eine definiert aufgetragene Menge) derselben Sonde mehrfach befinden.

Der dritte Schritt stellt eine Datentransformation dar, der die Varianzstabilisierung zum Ziel hat. Varianzstabilisierung meint hier das Generieren varianz-

stabilisierter Methylierungssignale im generalisierten logarithmischem Raum. Dies wurde bisher dadurch erreicht, dass, der Logarithmus des Verhältnisses von durch Cytosin (CG) und Thymin (TG) Oligonukleotiden generierten Meßdaten gebildet wurde (wie zuvor von Adorjan et al. Nucleic Acids Res. 2002 Mar 1;30(5):e21. beschrieben). Die generierten Daten sollten varianzstabilisiert sein, damit die Voraussetzungen zur Anwendung etablierter statistischer Auswertemethoden, wie der „maximum likelihood algorithm (ML)“ erfüllt sind. Statt der Verwendung des einfachen Logarithmus wird hierfür jedoch bevorzugt das generative Modell von Rocke verwendet, welches das spezifische (intensitätsabhängige, durch die Verwendung von Fluoreszenzintensitäten bedingte) Rauschen, das diesem Meßprozeß inhärent ist, berücksichtigt. Die Verwendung einer generalisierten log Skala anstelle des Logarithmus hat den Vorteil, daß auch negative Intensitätswerte, wie sie bei der Korrektur um das Hintergrundrauschen entstehen können, berücksichtigt werden können und sehr geringe Intensitäten stärker berücksichtigt werden.

Zur näheren Erläuterung der generalisierten log Skala sei hiermit auf die entsprechenden Veröffentlichungen von Rocke in der Fachzeitschrift „Bioinformatics“ hingewiesen (Durbin B and Rocke DR (2003) Estimation of transforamtion parameters for microarray data. Bioinformatics vol 19, no 11, pages 1360-1367).

Basierend auf der Verwendung von Negativkontrolloligos, und den damit generierten Intensitätsdaten kann eine globale (also mindestens für alle auf dem Mikroarray immobilisierten Oligonukleotidsondenpaare geltende)

Hintergrund-Hybridisierungs-Intensitätsverteilung

geschätzt werden. Negativkontrolloligos sind Detektionsoligos, die so entworfen werden, daß sie an keines der zu untersuchenden Amplifikate hybridisieren, die ja bei diesen Hybridisierungsexperimenten zur Methylierungsanalyse im Gegensatz zu Hybridisierungsexperimenten zur Expressionsanalyse bekannt sind. Der Mittelwert ( $\mu$ , mean) und die Varianz ( $\sigma^2$ , variance) für die Normalverteilung (z.B. nach Gauss) werden geschätzt.

Eine zuerst von Durbin und Rocke beschriebene Varianzstabilisierende Transformation (Durbin BP et al. (2002). A variance stabilizing transformation for gene expression microarray data *Bioinformatics*, **18**(1), 105-110) wird benutzt, um damit CG- und TG-Methylierungs-Meßwerte (=Intensitäten) pro Oligonukleotidsondenpaar in ein Methylierungs-Signal auf einer generalisierten log-Skala zu transformieren. Wie bereits erwähnt, ermöglicht diese generalisierten log Skala eine konsistente Behandlung bzw. Bewertung von niedrigen oder sogar negativen Intensitätssignalen. Diese so erhaltenen Methylierungs-Signale (methylation signals) erfüllen damit nun hinreichend die Voraussetzung zur Anwendung der üblichen Standard-Methoden der Statistik, wie statistischen Tests (zum Beispiel: dem „Student t-test“ oder dem „Hotelling multivariate T2 test“) und rechtferigen somit deren Verwendung.

Das Methylierungs-Signal hat die Eigenschaft, daß das Hybridisierungsrauschen eine nahezu konstante Varianz über den vollen Bereich aller möglichen Methylierungsniveaus zeigt. Es ist jedoch nur begrenzt aussagekräftig, um Aussagen über absolute

Methylierungswerte und daraus abgeleitete Vergleiche zwischen verschiedenen Detektionsoligo-Familien zu machen.

5 Der vierte Schritt aber, die eigentliche Kalibrierung der nun varianzstabilisierten Daten, hat es zum Ziel, die Methylierungs-Signale (methylation signals) in Methylierungs-Raten (methylation rates) zu verwandeln.

Die Methylierungs-Signale werden in diesem Schritt der Kalibrierung auf Kontroll-DNA Meßsignale (g log scores) 10 geeicht. Diese werden unter erfindungsgemäßer Verwendung unmethylierter Kontroll-DNA und definierter Anteile aufmethylierter Kontroll-DNA in separaten mehrfach wiederholten Mikroarray-Hybridisierungen generiert. Dabei werden die Methylierungs-Signale bestimmt, die den 15 Eichwerten (z.B. 0%, 10%, 90% und 100%) zugeordnet werden. Besonders bevorzugt ist hierbei die Ausführungsform in der nur die Kontroll-DNA-Meßsignale, die den Eichwerten 0% und 100% entsprechen produziert, oder benutzt werden. Mittels „maximum likelihood (ML)“ 20 Abschätzung können nun kalibrierte Methylierungs-Raten erhalten werden. Das kalibrierte Methylierungs-Signal ist somit die Methylierungs-Rate und quantifiziert den absoluten Anteil an methylierter DNA im Gemisch aus methylierter und unmethylierter DNA. Während bisher per 25 Mikroarray-Hybridisierung nur bestimmt werden konnte, ob ein Oligonukleotidsondenpaar in verschiedenen Proben signifikant unterschiedlich methyliert war, ist es jetzt möglich, Aussagen beispielsweise darüber zu treffen, ob diese signifikanten Unterschiede von beispielsweise 25% 30 im hohen oder niedrigen Methylierungsniveau liegen, also ob sich der Unterschied aus einer 95%igen Methylierung im

einen Fall und einer 70%igen Methylierung im anderen Fall ergibt, oder aber aus einer 45%igen Methylierung gegenüber einer 20%igen Methylierung.

5 Erfindungsgemäß ist demnach ein Verfahren zur Bestimmung von Methylierungsraten von DNA Proben mit Hilfe von Mikroarrays, welche CG- und TG-Oligomere enthalten, welches dadurch gekennzeichnet ist dass,

10 die Arrays mit zwei Kalibrierungsstandards hybridisiert werden, die definierte Methylierungsraten aufweisen;

anhand der erhaltenen Hybridisierungswerte mit Hilfe einer geeigneten Berechnungsmethode eine Kalibrierungskurve ermittelt wird, und

15 anhand dieser erstellten Kalibrierungskurve die tatsächlichen Methylierungsraten der untersuchten DNA Proben bestimmt werden.

Bevorzugt ist dieses Verfahren wobei die zwei Kalibrierungsstandards Methylierungsraten von 0% und 100% aufweisen, bzw, repräsentieren.

25 Ferner ist ein Verfahren nach Anspruch 18, bevorzugt, in welchem mehr als zwei Kalibrierungsstandards verwendet werden, die unterschiedliche Methylierungsraten aufweisen.

30 Eine besonders bevorzugte Ausführungsform ist ein Verfahren nach Anspruch 18, welches dadurch gekennzeichnet ist, dass die tatsächlichen Methylierungsraten in einem mehrstufigen Berechnungsprozeß bestimmt werden, der aus folgenden Schritten besteht:

- a) es wird eine Normalisierung der Hybridisierungswerte durchgeführt wird, wodurch Methylierungssignale ermittelt werden,
  - b) eine Transformation dieser Signale mit dem Ziel einer Varianzstabilisierung wird durchgeführt,
  - c) die Methylierungsraten werden unter Verwendung der Kalibrierungsstandards und eines geeigneten maximum-likelihood-algorithmus bestimmt.
- 10 Besonders bevorzugt ist dieses Verfahren, wenn vor der Normalisierung der Hybridisierungswerte, diese um das der Meßmethode inhärente Hintergrundrauschen korrigiert werden.

15

Die weiter oben beschriebenen Kontrollen oder Standards lassen sich bei allen Methoden der quantitativen Methylierungsanalyse verwenden: u.a. bei MS-SnuPE, bei Hybridisierung auf Mikroarrays, Hybridisierungsassays in Lösung, direkte Bisulfit-Sequenzierung, bei Real Time PCR (z.B. Heavy Methyl, MSP. vgl. zu den PMR-Werten: Eads et al., CANCER RESEARCH 61, 3410-3418, April 15, 2001),

25 Eine besonders bevorzugte Verwendung der durch WGA-Verfahren hergestellten DNA und des erfindungsgemäßen Verfahrens liegt in der Diagnose von Krebserkrankungen oder anderen mit einer Veränderung des Methylierungsstatus assoziierten Krankheiten. Hierzu gehören u.a. CNS-Fehlfunktionen, Aggressionssymptome oder Verhaltensstörungen; klinische, psychologische und soziale Konsequenzen von Gehirnschädigungen; psychotische Störungen und

30

Persönlichkeitsstörungen; Demenz und/oder assoziierte Syndrome; kardiovaskuläre Krankheit, Fehlfunktion und Schädigung; Fehlfunktion, Schädigung oder Krankheit des gastrointestinalen Traktes; Fehlfunktion, Schädigung oder Krankheit des Atmungssystems; Verletzung, Entzündung, Infektion, Immunität und/oder Rekonvaleszenz; Fehlfunktion, Schädigung oder Krankheit des Körpers als Abweichung im Entwicklungsprozess; Fehlfunktion, Schädigung oder Krankheit der Haut, der Muskeln, des Bindegewebes oder der Knochen; endokrine und metabolische Fehlfunktion, Schädigung oder Krankheit; Kopfschmerzen oder sexuelle Fehlfunktion. Das erfindungsgemäße Verfahren eignet sich außerdem zur Vorhersage von unerwünschten Arzneimittelwirkungen und zur Unterscheidung von Zelltypen oder Geweben oder zur Untersuchung der Zelldifferenzierung.

Erfindungsgemäß ist weiterhin ein Kit, der aus Reagenzien zur Durchführung eines WGA-Verfahrens oder aus bereits über ein WGA-Verfahren amplifizierter DNA sowie aus Reagenzien zur Durchführung einer Bisulfitumwandlung besteht, und optional auch eine Polymerase, Primer und/oder Sonden für eine Amplifikation und Detektion enthält.

Erfindungsgemäß ist auch vollständig methylierte DNA, die über ein WGA-Verfahren hergestellt und anschließend mittels eines Enzyms, bevorzugt der Sss1 Methylase, methyliert wurde. Erfindungsgemäß ist schließlich auch ein Gemisch aus methylierter und nicht-methylierter, über ein genomweites Amplifikationsverfahren hergestellter DNA. Die Verwendung eines solchen Gemisches insbesondere als Standard in der Methylierungsanalyse ist ein wesentlicher Teil der vorliegenden Erfindung. Es ist bevorzugt, daß

die Herstellung des Gemisches erfolgt, wie oben beschrieben.

5 Bevorzugt sind Gemische mit einem Anteil von 1%, 2%, 5%, 10%, 25%, 50%, methylierter DNA, sowie Gemische mit einem Anteil von 99%, 98%, 95%, 90%, 75%, 50%. Für die Verwendung in der Mikroarray-Anwendung sind neben der Verwendung der Standards 0% und 100% eher niedrig konzentrierte Mischungen, also 1%, 2%, 5%, 10%, 25% und 50%, bevorzugt.  
10 Bevorzugt ist auch die Verwendung von Mischungen im hohen Konzentrationsbereich, also 99%, 98%, 95%, 90%, 75% und 50%.

Besonders bevorzugt ist jedoch die vorteilhafte gleichzeitige Verwendung von Mischungen im hohen Konzentrationsbereich sowie im niedrigen Konzentrationsbereich.  
15

Bevorzugt ist auch die Verwendung von 100% unmethylierter und 100% methylierter DNA.

20 Für die Verwendung im „sensitive detection“ Bereich, zum Beispiel mit Assays wie HeavyMethyl und MSP ist es bevorzugt, daß folgende Mischungsverhältnisse benutzt werden: 1:10000, 1:5000, 1:2500, 1:1000, 1:500, 1:200, 1:100. Für MSP-Assays werden entsprechend kleinere Konzentrationen  
25 bevorzugt verwendet etwa 1:10000, 1:5000, 1:2500, 1:1000, 1:500, 1:200, 1:100.

Beispiele:

30 **Beispiel 1:** Verwendung von MDA-DNA für Kalibrierungen

Der Methylierungsgrad einer DNA aus abdominalem Fettgewebe soll mittels Oligonukleotid-Mikroarrays und



zum Vergleich mittels des MS-SNuPE-Verfahrens bestimmt werden. Hierzu wird die DNA aus der biologischen Probe mit Hilfe des QIAamp Mini Kits (Qiagen) nach Herstellerangaben extrahiert. Zur Aufnahme einer

5 Kalibrierungskurve werden unterschiedliche Mischungen methylierter und nicht-methylierter DNA hergestellt (0%, 25%, 50%, 75%, 100% methylierter DNA). Die nicht-methylierte DNA wurde über Molecular Staging bezogen, wo sie über eine MDA-Reaktion aus humaner genomischer DNA

10 aus ganzem Blut hergestellt worden war. Bei einer MDA-Reaktion werden alle Methylierungssignale gelöscht (s.o.). Die vollständig methylierte DNA wird aus der MDA-DNA mittels einer Sss1-Methylase (New England Biolabs) hergestellt. Die Synthese erfolgt nach Herstellerangaben.

15 Die übrige nicht-methylierte DNA wird dabei ebenso mit allen Reagenzien bis auf die Sss1-Methylase umgesetzt. So ist sichergestellt, dass die DNA-Konzentration in beiden Ansätzen identisch ist, und in beiden Ansätzen die gleichen Reaktionskomponenten anwesend sind. Anschließend

20 werden nicht-methylierte und methylierte DNA in folgenden Verhältnissen gemischt: 4:0 für 0%, 3:1 für 25%, 2:2 für 50%, 1:3 für 75%, 0:4 für 100%. Die DNA wird anschließend in Gegenwart von Dioxan als denaturierendem Lösemittel Bisulfit-umgewandelt (vgl.: DE 10029 915 A1; deutsche

25 Anmeldung: AZ: 10347396.3). Anschließend werden die erstellten DNA-Gemische und die DNA aus der biologischen Probe (sample) in einer Multiplex-PCR eingesetzt. Dabei werden jeweils 8 Fragmente amplifiziert. Als Primer werden die in Tabelle 1 aufgeführten Oligonukleotide

30 verwendet. Die Amplifikationen werden mittels des QIAGEN HotStarTaq-Kits im wesentlichen nach Herstellerangaben und mit dem folgenden Temperaturprofil durchgeführt:

95°C: 15 min; 45 mal: (95°C: 15sec; 55°C: 30sec; 72°C: 60 sec); 72°C : 10 min. Die Multiplex-PCR-Produkte werden anschließend an ein Oligomer-Mikroarray hybridisiert. Die Sonden-Oligonukleotide sind in Tabelle 2 angegeben. Die

5 Hybridisierung und die Methylierungs-Signal-Ermittlung erfolgen dabei wie bei Adorjan et al., 2002 (a.a.o.) beschrieben. Für jede Probe und jeden Kalibrierungsmix werden acht Hybridisierungen durchgeführt. Für die Erstellung von Kalibrierungskurven für eine CpG-Position

10 wird die gemessene Methylierungsrate gegen die theoretische Methylierungsrate aufgetragen. Die gemessene Methylierungsrate ergibt sich aus der Signalintensität einer Oligonukleotidsonde, die für den methylierten Status spezifisch ist, dividiert durch die

15 Gesamtintensität dieser Sonde + einer dazu passenden (also die gleiche CpG-Position abdeckenden) Sonde, die spezifisch ist für den nicht-methylierten Status. Der theoretische Methylierungsstatus entspricht den Methylierungsniveaus der verwendeten definierten

20 Mischungen. Oligonukleotidsonden-Paare, die für Kalibrierungszwecke geeignet sind, weisen monoton steigende Kalibrierungskurven auf. Für die Ms-SNuPE-Reaktion werden die Proben mit den oben aufgeführten Primern in einzelnen PCR-Reaktionen amplifiziert. Die

25 Reaktionsbedingungen sind die gleichen wie für die Multiplex-PCR (s.o.). In der Extensionsreaktion werden als Primer-Bindungsstellen Positionen verwendet, die direkt flankierend zu CpG-Positionen liegen, die denen der Oligonukleotid-Mikroarrays entsprechen. Der Ms-SnuPE-

30 Assay wird entsprechend den Herstellerangaben des MegaBace-SNuPE-Kits durchgeführt. Für die beiden möglichen Varianten des einzubauenden Nucleotides werden

mit unterschiedlichen Farbstoffen markierte ddNTPs verwendet. Für jeden SNUPE-Assay werden vier Messungen parallel durchgeführt. Die von der SNP-Profile-Software (Amersham) ermittelten Signalintensitäten ( $I_{\text{meth-}}$  für unmethyliert-spezifische Sonden und  $I_{\text{meth+}}$  für methyliert-spezifische Sonden) der beiden verwendeten Farbstoffe werden entsprechend des Quotienten  $I_{\text{meth+}} / (I_{\text{meth-}} + I_{\text{meth+}})$  verwendet, um die gemessene Methylierungsrate zu ermitteln. Durch das Auftragen dieser Werte gegen die theoretische Methylierungsrate erhält man wiederum eine Kalibrierungskurve, die monoton steigend sein sollte. Die so erzeugten monoton steigenden Kalibrierungskurven werden verwendet, um aus der gemessenen Methylierungsrate von Proben-DNA die tatsächliche Methylierung zu ermitteln.

Die mit den beiden Methoden Mikroarray-Analyse (chip) und SNUPE ermittelten und an entsprechenden Kalibrierungskurven korrigierten Methylierungsraten in Proben-DNA stimmen für die gezeigten CpG-Positionen gut überein. Diese Daten zeigen, dass die über MDA-hergestellte nicht-methylierte DNA bzw. entsprechende Gemische mit methylierter DNA sehr gut als Standard in der Methylierungsanalyse verwendet werden kann.

## Beispiel 2:

Die Ergebnisse eines analog durchgeführten Experimentes mit jedoch zum Teil differierenden Oligosequenzen sind in Abbildung 1 dargestellt. Die y-Achse zeigt den Prozentsatz an Methylierung, die x-Achse die Hybridisierung an verschiedene Oligonukleotide bzw. verschiedene SNUPE-Assays.

5     Abbildungen

Abbildung 1:

Die Abbildung 1 zeigt die Ergebnisse eines analog zu  
Beispiel 1 beschriebenen Experimentes. Die y-Achse zeigt  
den ermittelten Prozentsatz an Methylierung, die x-Achse  
10     gibt an dass verschiedene Amplifikate (1-5) untersucht  
wurden. Die verschiedenen Schraffuren zeigen an mit  
welcher Methode dieser Wert bestimmt worden ist. Die  
Hybridisierung an verschiedene immobilisierte  
Oligonukleotide wird hierin als „chip“ indiziert und die  
15     alternativ eingesetzte Methode ist der SNUPE-Assay,  
bezeichnet als „SnuPE“. Weiterhin ist angegeben, ob es  
sich um 100% aufmethylierte DNA (100%), 0% methylierte  
also unmethylierte DNA (0%) oder natürlicherweise  
vorkommende DNA aus dem menschlichen Abdominalgewebe  
20     handelt. Die mit den beiden Methoden ermittelten und an  
entsprechenden Kalibrierungskurven korrigierten  
Methylierungsraten in Proben-DNA stimmen für die  
gezeigten CpG-Positionen gut überein.

25     Die Abbildungen 2 und 3 zeigen Plots, die an der Y-Achse  
die absoluten Methylierungsraten (methylation levels) in  
Brustkrebsproben und Lymphozyten Proben angeben. Für  
jedes Detektionsoligo sind Minimum- und Maximum-  
Hybridisierungsintensitäten bestimmt worden. Dies gelang  
30     durch Hybridisierung mit völlig unmethylierter

menschlicher DNA (Molecular Staging, new haven, CT) einerseits und enzymatisch methylierter Kontroll-DNA (Sss1; New England Biomedical), als Kalibrierungsstandards, andererseits. Der Anteil der

5 Methylierung einer Probe an einer bestimmten CpG Position wird ermittelt durch lineare Interpolation zwischen der entsprechenden Minimumintensität (0% Methylierung von CG-Oligos, 100% Methylierung für TG-oligos) und der Maximumintensität (100% Methylierung von CG-Oligos, 0%

10 Methylierung für TG-oligos). Die lineare Interpolation wird durch Anwendung eines „Maximum Likelihood Algorithmus“ durchgeführt, der die hybridisierungsspezifische Fehlerverteilung (siehe hierzu

15 for gene expression arrays, Journal of Computational Biology, 8, 557-569) berücksichtigt. Wahrscheinlichkeiten (likelihoods) von CG- und TG-Oligomeren derselben CpG Position werden kombiniert in einen Wert für den Methylierungsanteil. Abbildungen 2 und 3 zeigen die

20 Verteilung von ermittelten Methylierungsraten für jede CpG Position, in der Reihenfolge geordnet nach dem Median der Methylierungsrate.

In Abbildung 2 sind Ergebnisse von Lymphozyten Proben gezeigt.

25 In Abbildung 3 sind Ergebnisse von Brustkrebsdaten gezeigt.

*Tabelle 1: Primer für die Multiplex-Amplifikation*

Gen Name	RefSeq-ID	Primer Orientierung	Sequenz
ERS1	NM_000125 & NM_002920	forward	AGGAGGGGGAATTAAATAGA

		reverse	ACAATAAAACCATCCCAAATAC
AR	NM_000044	forward	GTAGTAGTAGTAGTAAGAGA
		reverse	ACCCCTAAATAATTATCCT
CDKN2a	NM_000077	forward	GGGGTTGGTTGGTTATTAGA
		reverse	AACCCTCTACCCACCTAAAT
CDKN2B	NM_004936	forward	GGTTGGTTGAAGGAATAGAAAT
		reverse	CCCACTAAACATACCCTTATTC
GSTP1	NM_000852	forward	ATTTGGGAAAGAGGGAAAG
		reverse	TAAAACTCTAAACCCCATCC
TP73	NM_005427	forward	AGTAAATAGTGGGTGAGTTATGAA
		reverse	GAAAAACCTCTAAAACTACTCTC C
MLH1	NM_000249	forward	TAAGGGGAGAGGAGGAGTTT
		reverse	ACCAATTCTCAATCATCTCTTT
MGMT	NM_002412	forward	AAGGTTTTAGGGAAGAGTGTTT
		reverse	ACCTTTTCCTATCACAAAATAA

Tabelle 2: Oligonukleotidsonden

Name des Oligonukleotids	Sequenz
Oligonukleotidsonden für ERS1	
ERS1:204A209	ATTTAGTAGCGACGATAAGT
ERS1:204A204	GTAGCGACGATAAGTAAAGT
ERS1:204A217	TTAGTAGCGACGATAAGTAAA
ERS1:204A2212	TTTATTTAGTAGCGACGATAAG
ERS1:204B237	TTAGTAGTGATGATAAGTAAAGT
ERS1:204B2413	TTTTATTTAGTAGTGATGATAAGT
ERS1:204B2512	TTTATTTAGTAGTGATGATAAGTAA
ERS1:204B2511	TTATTTAGTAGTGATGATAAGTAAA
ERS1:248A195	GGGATCGTTTTAAATCGAG
ERS1:248A204	GGATCGTTTTAAATCGAGTT

Name des Oligonukleotids	Sequenz
ERS1:248A206	TGGGATCGTTTTAAATCGAG
ERS1:248A213	GATCGTTTTAAATCGAGTTGT
ERS1:248B216	TGGGATTGTTTTAAATTGAGT
ERS1:248B223	GATTGTTTTAAATTGAGTTGTG
ERS1:248B224	GGATTGTTTTAAATTGAGTTGT
ERS1:248B228	TTTGGGATTGTTTTAAATTGAG
ERS1:607A183	GTTTCGCGGTTACGGATTA
ERS1:607A193	GTTTCGCGGTTACGGATTAT
ERS1:607A194	TGTTTCGCGGTTACGGATTA
ERS1:608A203	GTTTCGCGGTTACGGATTATG
ERS1:607B213	GTTTGTGGTTATGGATTATGA
ERS1:607B219	TATTTTGTGTGGTTATGGA
ERS1:607B215	TTGTTTGTGGTTATGGATTAT
ERS1:607B227	TTTTGTTTGTGGTTATGGATTA
ERS1:451A193	TATCGGATTCGTAGGTTTT
ERS1:451A204	TTATCGGATTCGTAGGTTTT
ERS1:451A206	TTTTATCGGATTCGTAGGTT
ERS1:451A207	GTTTTATCGGATTCGTAGGT
ERS1:451B218	GGTTTTATTGGATTTGTAGGT
ERS1:451B226	TTTTATTGGATTTGTAGGTTTT
ERS1:451B227	GTTTTATTGGATTTGTAGGTTT
ERS1:451B237	GTTTTATTGGATTTGTAGGTTTT
Oligonukleotidsonden für AR	
AR:971A188	AGTATTTTCGGACGAGGA
AR:971A183	TTTCGGACGAGGATGATT
AR:971A196	TATTTTCGGACGAGGATGA
AR:971A1910	TTAGTATTTTCGGACGAGG
AR:971B218	AGTATTTTGGATGAGGATGA
AR:971B2112	TGTTAGTATTTTGGATGAGG

Name des Oligonukleotids	Sequenz
AR:971B213	TTTTGGATGAGGATGATTTAG
AR:971B217	GTATTTTTTGGATGAGGATGAT
AR:1137°164	GTAGCGGGAGAGCGAG
AR:1137°175	AGTAGCGGGAGAGCGAG
AR:1137°186	TAGTAGCGGGAGAGCGAG
AR:1137B183	TAGTGGGAGAGTGAGGGA
AR:1137B185	AGTAGTGGGAGAGTGAGG
AR:1137B197	GTAGTAGTGGGAGAGTGAG
AR:1137B174	GTAGTGGGAGAGTGAGG
AR:869A195	ATAGTCGTAGTCGGTTTTG
AR:869A208	TTTATAGTCGTAGTCGGTTT
AR:869A219	TTTTATAGTCGTAGTCGGTTT
AR:869A2111	ATTTTTATAGTCGTAGTCGGT
AR:869B193	AGTTGTAGTTGGTTTTGGA
AR:869B2212	AATTTTTATAGTTGTAGTTGGT
AR:869B2313	TAATTTTTATAGTTGTAGTTGGT
AR:869B2414	GTAATTTTTATAGTTGTAGTTGGT
AR:814A228	AAGTTTATCGTAGAGGTTTTAT
AR:814A2212	TTTAAAGTTTATCGTAGAGGTT
AR:814A2310	TTAAGTTTATCGTAGAGGTTTAT
AR:814A238	AAGTTTATCGTAGAGGTTTTATA
AR:814B228	AAGTTTATTGTAGAGGTTTTAT
AR:814B2210	TTAAGTTTATTGTAGAGGTTTT
AR:814B2212	TTTAAAGTTTATTGTAGAGGTT
AR:814B2211	TTTAAAGTTTATTGTAGAGGTTT
Oligonukleotidsonden für CDKN2A	
CDKN2A:2147A173	GGGCGTTGTTTAACGTA
CDKN2A:2147A183	GGGCGTTGTTTAACGTAT
CDKN2A:2147B195	GGGGTGTTGTTTAATGTA



Name des Oligonukleotids	Sequenz
CDKN2A:2147B194	GGGGTGTTGTTTAATGTAT
CDKN2A:2157A217	TGTTTAAACGTATCGAATAGTT
CDKN2A:2157A227	TGTTTAAACGTATCGAATAGTTA
CDKN2A:2157A228	TTGTTTAAACGTATCGAATAGTT
CDKN2A:2157A238	TTGTTTAAACGTATCGAATAGTTA
CDKN2A:2157B229	GTTGTTTAAATGTATTGAATAGT
CDKN2A:2157B239	GTTGTTTAAATGTATTGAATAGTT
CDKN2A:2157B249	GTTGTTTAAATGTATTGAATAGTTA
CDKN2A:2183A176	GGAGGTCGATTTAGGTG
CDKN2A:2183A186	GGAGGTCGATTTAGGTGG
CDKN2A:2183B186	GGAGGTTGATTTAGGTGG
CDKN2A:2172A183	TTACGGTCGGAGGTCGAT
CDKN2A:2172A165	AGTTACGGTCGGAGGT
CDKN2A:2172A176	TAGTTACGGTCGGAGGT
CDKN2A:2172A188	AATAGTTACGGTCGGAGG
CDKN2A:2172B198	AATAGTTATGGTTGGAGGT
CDKN2A:2172B209	GAATAGTTATGGTTGGAGGT
CDKN2A:2172B194	GTTATGGTTGGAGGTTGAT
CDKN2A:2172B203	TTATGGTTGGAGGTTGATTT
Oligonukleotidsonden für CDKN2B	
CDKN2B:2279A185	GTTTACGGTTAACGGTGG
CDKN2B:2279A183	TTACGGTTAACGGTGGAT
CDKN2B:2279A197	AAGTTTACGGTTAACGGTG
CDKN2B:2279A209	TTAAGTTTACGGTTAACGGT
CDKN2B:2279B206	AGTTTATGGTTAATGGTGGA
CDKN2B:2279B216	AGTTTATGGTTAATGGTGGA
CDKN2B:2279B223	TTATGGTTAATGGTGATTATT
CDKN2B:2279B2210	GTTAAGTTTATGGTTAATGGTG
CDKN2B:2330A156	GGAATGCGCGAGGAG

Name des Oligonukleotids	Sequenz
CDKN2B:2330A165	GAATGCGCGAGGAGAA
CDKN2B:2330A175	GAATGCGCGAGGAGAAT
CDKN2B:2330A184	AATGCGCGAGGAGAATAA
CDKN2B:2330B186	GGAATGTGTGAGGAGAAT
CDKN2B:2330B196	GGAATGTGTGAGGAGAATA
CDKN2B:2330B205	GAATGTGTGAGGAGAATAAG
CDKN2B:2329B206	GGAATGTGTGAGGAGAATAA
CDKN2B:2234A168	AGAGAGTGCCTCGGAG
CDKN2B:2234A167	GAGAGTGCCTCGGAGT
CDKN2B:2234A166	AGAGTGCCTCGGAGTA
CDKN2B:2234A176	AGAGTGCCTCGGAGTAG
CDKN2B:2234B178	AGAGAGTGTGTTGGAGT
CDKN2B:2234B188	AGAGAGTGTGTTGGAGTA
CDKN2B:2234B187	GAGAGTGTGTTGGAGTAG
CDKN2B:2234B198	AGAGAGTGTGTTGGAGTAG
CDKN2B:2268A193	TGTCGTTAAGTTTACGGTT
CDKN2B:2268A194	GTGTCGTTAAGTTTACGGT
CDKN2B:2268A205	AGTGTCTTAAGTTTACGGT
CDKN2B:2268A203	TGTCGTTAAGTTTACGGTTA
CDKN2B:2268B215	AGTGTGTTAAGTTTATGGTT
CDKN2B:2268B216	GAGTGTGTTAAGTTTATGGT
CDKN2B:2268B224	GTGTTGTTAAGTTTATGGTTAA
CDKN2B:2268B225	AGTGTGTTAAGTTTATGGTTA
Oligonukleotidsonden für MGMT	
MGMT:597A188	GGATTATTCGGGTACGTG
MGMT:597A184	TATTCGGGTACGTGGTAG
MGMT:597A186	ATTATTCGGGTACGTGGT
MGMT:597A196	ATTATTCGGGTACGTGGTA
MGMT:597B193	ATTTGGGTATGTGGTAGGT

Name des Oligonukleotids	Sequenz
MGMT:597B205	TTATTTGGGTATGTGGTAGG
MGMT:597B204	TATTTGGGTATGTGGTAGGT
MGMT:597B2212	TTTAGGATTATTTGGGTATGTG
MGMT:621A174	TGTACGTTTCGCGGATTA
MGMT:621A183	GTACGTTTCGCGGATTATT
MGMT:621A185	TTGTACGTTTCGCGGATTA
MGMT:621A184	TGTACGTTTCGCGGATTAT
MGMT:621B217	GTTTGTATGTTTGTGGATTAT
MGMT:621B224	TGTATGTTTGTGGATTATTTT
MGMT:621B223	GTATGTTTGTGGATTATTTT
MGMT:621B225	TTGTATGTTTGTGGATTATTT
MGMT:394A197	TTTTGGACGGTATCGTTTA
MGMT:394A206	TTTGGACGGTATCGTTTATT
MGMT:394A208	TTTTTGGACGGTATCGTTTA
MGMT:394A213	GGACGGTATCGTTTATTATAG
MGMT:394B2111	TAGTTTTTGGATGGTATTGTT
MGMT:394B229	GTTTTTGGATGGTATTGTTTAT
MGMT:394B234	TGGATGGTATTGTTTATTATAGG
MGMT:394B237	TTTTGGATGGTATTGTTTATTAT
MGMT:530A173	TTTCGAGTAGGATCGGG
MGMT:530A184	GTTTCGAGTAGGATCGGG
MGMT:530A183	TTTCGAGTAGGATCGGGA
MGMT:530A193	TTTCGAGTAGGATCGGGAT
MGMT:530B194	GTTTTGAGTAGGATTGGGA
MGMT:530B193	TTTTGAGTAGGATTGGGAT
MGMT:530B203	TTTTGAGTAGGATTGGGATT
MGMT:530B204	GTTTTGAGTAGGATTGGGAT
Oligonukleotidsonden für MLH1	
MLH1:1753A176	GAAGAGCGGATAGCGAT

Name des Oligonukleotids	Sequenz
MLH1:1753A185	AAGAGCGGATAGCGATTT
MLH1:1753A184	AGAGCGGATAGCGATTTT
MLH1:1753A193	GAGCGGATAGCGATTTTTA
MLH1:1753B198	AGGAAGAGTGGATAGTGAT
MLH1:1753B2110	ATAGGAAGAGTGGATAGTGAT
MLH1:1753B214	AGAGTGGATAGTGATTTTAA
MLH1:1753B226	GAAGAGTGGATAGTGATTTTAA
MLH1:2026A186	AAATGTCGTTTCGTGGTAG
MLH1:2026A197	AAAATGTCGTTTCGTGGTAG
MLH1:2026A1910	GTTAAAATGTCGTTTCGTGG
MLH1:2026A209	TTAAAATGTCGTTTCGTGGTA
MLH1:2026B195	AATGTTGTTTGTGGTAGGG
MLH1:2026B207	AAAATGTTGTTTGTGGTAGG
MLH1:2026B218	TAAAATGTTGTTTGTGGTAGG
MLH1:2026B2110	GTTAAAATGTTGTTTGTGGTA
MLH1:1770A186	TTTAAACGCGTAAGCGTA
MLH1:1770A194	TTAACGCGTAAGCGTATAT
MLH1:1770A195	TTTAAACGCGTAAGCGTATA
MLH1:1770A203	TAACGCGTAAGCGTATATTT
MLH1:1770B239	GATTTTAAATGTGTAAGTGTATA
MLH1:1770B234	TTAATGTGTAAGTGTATATTTT
MLH1:1770B249	GATTTTAAATGTGTAAGTGTATAT
MLH1:1770B259	GATTTTAAATGTGTAAGTGTATATT
MLH1:1939A173	GAACGTGAGTACGAGGT
MLH1:1939A183	GAACGTGAGTACGAGGTA
MLH1:1939A185	AAGAACGTGAGTACGAGG
MLH1:1939A186	GAAGAACGTGAGTACGAG
MLH1:1939B207	GGAAGAATGTGAGTATGAGG
MLH1:1939B208	AGGAAGAATGTGAGTATGAG

Name des Oligonukleotids	Sequenz
MLH1:1939B216	GAAGAATGTGAGTATGAGGTA
MLH1:1939B213	GAATGTGAGTATGAGGTATTG
Oligonukleotidsonden für TP73	
TP73:750A174	GATTCGTTGCGGTTAGA
TP73:750A184	GATTCGTTGCGGTTAGAG
TP73:750A183	ATTCGTTGCGGTTAGAGA
TP73:750A185	GGATTCGTTGCGGTTAGA
TP73:750B205	GGATTTGTTGTGGTTAGAGA
TP73:750B213	ATTTGTTGTGGTTAGAGAATT
TP73:750B214	GATTTGTTGTGGTTAGAGAAT
TP73:750B223	ATTTGTTGTGGTTAGAGAATTT
TP73:1082A164	GGTGCGCGTAGAGAAT
TP73:1082A166	TTGGTGCGCGTAGAGA
TP73:1082A165	TGGTGCGCGTAGAGAA
TP73:1082A174	GGTGCGCGTAGAGAATA
TP73:1082B1810	AGGTTTGGTGTGTGTAGA
TP73:1082B195	TGGTGTGTGTAGAGAATAA
TP73:1082B207	TTTGGTGTGTGTAGAGAATA
TP73:1082B217	TTTGGTGTGTGTAGAGAATAA
TP73:858A186	GGATATCGGTTCCGAGTT
TP73:858A189	AGAGGATATCGGTTCCGA
TP73:858A195	GATATCGGTTCCGAGTTAG
TP73:858A193	TATCGGTTCCGAGTTAGAT
TP73:858B2011	GTAGAGGATATTGGTTTGGA
TP73:858B208	GAGGATATTGGTTTGAGTT
TP73:858B224	ATATTGGTTTGAGTTAGATTA
TP73:858B235	GATATTGGTTTGAGTTAGATTA
TP73:1135A204	ATATCGAACGGGATTTAGAG
TP73:1135A2112	TTTTTTAAATATCGAACGGGA

Name des Oligonukleotids	Sequenz
TP73:1135A228	TTAAATATCGAACGGGATTAG
TP73:1135A229	TTTAAATATCGAACGGGATTTA
TP73:1135B224	ATATTGAATGGGATTAGAGTT
TP73:1135B237	TAAATATTGAATGGGATTAGAG
TP73:1135B248	TTAAATATTGAATGGGATTAGAG
TP73:1135B2413	TTTTTTTAAATATTGAATGGGATT
Oligonukleotidsonden für GSTP1	
GSTP1:1900A157	GGGAGTTCGCGGGAT
GSTP1:1900A166	GGAGTTCGCGGGATTT
GSTP1:1900A175	GAGTTCGCGGGATTTTT
GSTP1:1900A185	GAGTTCGCGGGATTTTTT
GSTP1:1900B177	GGGAGTTTGTGGGATTT
GSTP1:1900B187	GGGAGTTTGTGGGATTTT
GSTP1:1900B196	GGAGTTTGTGGGATTTTTT
GSTP1:1900B206	GGAGTTTGTGGGATTTTTTA
GSTP1:2007A196	GAGTTTCGTCGTCGTAGTT
GSTP1:2007B198	TGGAGTTTGTGTTGTAG
GSTP1:2007B219	TTGGAGTTTGTGTTGTAGT
GSTP1:2126A207	GGTTTTTCGTTTATTTTCGAG
GSTP1:2126A216	GTTTTTCGTTTATTTTCGAGAT
GSTP1:2126A218	AGGTTTTTCGTTTATTTTCGAG
GSTP1:2126A226	GTTTTTCGTTTATTTTCGAGATT
GSTP1:2126B217	GGTTTTTGTGTTATTTTGAGA
GSTP1:2126B227	GGTTTTTGTGTTATTTTGAGAT
GSTP1:2126B228	AGGTTTTTGTGTTATTTTGAGA
GSTP1:2126B2310	GTAGGTTTTTGTGTTATTTTGAG
GSTP1:2142A153	ATTCGGGACGGGGT
GSTP1:2142A154	GATTCGGGACGGGGG
GSTP1:2142A155	AGATTCGGGACGGGG

Name des Oligonukleotids	Sequenz
GSTP1:2142A156	GAGATTCGGGACGGG
GSTP1:2142B174	GATTTGGGATGGGGGTT
GSTP1:2142B175	AGATTTGGGATGGGGGT
GSTP1:2142B176	GAGATTTGGGATGGGGG
GSTP1:2142B184	GATTTGGGATGGGGGTTT
Oligonukleotidsonden für CDH13 C	
CDH13:137A1810	ATGTTATTTTCGCGGGGT
CDH13:137B1910	ATGTTATTTTGTGGGGTT
CDH13:137B2011	GATGTTATTTTGTGGGGTT
CDH13:153A174	TTTTCGCGAGGTGTTTA
CDH13:153A184	TTTTCGCGAGGTGTTTAT
CDH13:153A185	TTTTTCGCGAGGTGTTTA
CDH13:153A195	TTTTTCGCGAGGTGTTTAT
CDH13:153B206	GTTTTTTGTGAGGTGTTTAT
CDH13:153B215	TTTTTTTGTGAGGTGTTTATTT
CDH13:153B216	GTTTTTTGTGAGGTGTTTATTT
CDH13:153B226	GTTTTTTGTGAGGTGTTTATTT
CDH13:187A173	AAACGAGGGAGCGTTAG
CDH13:187A174	AAAACGAGGGAGCGTTA
CDH13:187A175	TAAAACGAGGGAGCGTT
CDH13:187A185	TAAAACGAGGGAGCGTTA
CDH13:187B183	AAATGAGGGAGTGTTAGG
CDH13:187B193	AAATGAGGGAGTGTTAGGA
CDH13:187B194	AAAATGAGGGAGTGTTAGG
CDH13:187B197	TGTAAAATGAGGGAGTGT
CDH13:22°203	GGTCGTTAGTTTTTCGTGTA
CDH13:22B203	GGTTGTTAGTTTTTTGTGTA
CDH13:22B213	GGTTGTTAGTTTTTTGTGTAA
CDH13:22B214	TGGTTGTTAGTTTTTTGTGTA

Name des Oligonukleotids	Sequenz
CDH13:22B223	GGTTGTTAGTTTTTGTGTAAT



Alle in dieser Beschreibung angegebenen Literaturstellen  
und Referenzen werden hiermit in ihrem vollen Umfang in  
den Offenbarungsgehalt der vorliegenden Anmeldung  
5 eingeschlossen

## Patentansprüche

1. Verfahren zur Methylierungsanalyse, dadurch gekennzeichnet, dass  
5       a) eine genomweite Amplifikation durchgeführt wird,  
       b) die in a) generierten Amplifikate als Standard in der Methylierungsanalyse verwendet werden
- 10   2. Verwendung von durch genomweite Amplifizierungsverfahren hergestellter DNA als Standard in der Methylierungsanalyse.
- 15   3. Verfahren oder Verwendung nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, dass als Amplifikationsverfahren PEP, DOP-PCR oder Linker-PCR durchgeführt werden.
- 20   4. Verfahren oder Verwendung nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, dass als Amplifikationsverfahren eine "Multiple Displacement Amplification" (MDA) durchgeführt wird.
- 25   5. Verfahren oder Verwendung nach Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, dass in der MDA eine  $\phi$ 29-Polymerase eingesetzt wird.
- 30   6. Verfahren oder Verwendung nach Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, dass die MDA mittels eines kommerziell erhältlichen Kits erfolgt.

7. Verfahren oder Verwendung nach Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, dass als Kit „GenomiPhi“ (Amersham Biosciences) oder „Repli-g“ (Molecular Staging) verwendet wird.
- 5 8. Verfahren oder Verwendung nach Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, dass als Standard kommerziell erhältliche, über MDA hergestellte DNA verwendet wird.
- 10 9. Verfahren oder Verwendung nach mindestens einem der Ansprüche 1-8, dadurch gekennzeichnet, dass die Methylierungsanalyse über Restriktionsenzyme erfolgt.
- 15 10. Verfahren oder Verwendung nach mindestens einem der Ansprüche 1-8, dadurch gekennzeichnet, dass die Methylierungsanalyse nach Umwandlung der DNA in eine Form, in der sich methylierte Cytosine von unmethylierten Cytosinen mittels Hybridisierung unterscheiden lassen, über methylierungsspezifische Ligationsverfahren, MSP, Heavy Methyl oder MethyLight erfolgt.
- 20 11. Verfahren oder Verwendung nach mindestens einem der Ansprüche 1-8, dadurch gekennzeichnet, dass die Methylierungsanalyse nach Umwandlung der DNA in eine Form, in der sich methylierte Cytosine von unmethylierten Cytosinen mittels Hybridisierung unterscheiden lassen, über Primer-Extension erfolgt.
- 25 12. Verfahren oder Verwendung nach mindestens einem der Ansprüche 1-11, dadurch gekennzeichnet, dass die Methylierungsanalyse nach Umwandlung der DNA in eine Form, in der sich methylierte Cytosine von unmethylierten Cytosinen mittels Hybridisierung unterscheiden lassen, über ei-
- 30

ne Amplifikation und eine Hybridisierung der Amplifikate an Oligomer-Mikroarrays erfolgt.

5 13. Verfahren oder Verwendung nach mindestens einem der Ansprüche 1-12, dadurch gekennzeichnet, dass die Methylierungsanalyse nach Umwandlung der DNA in eine Form, in der sich methylierte Cytosine von unmethylierten Cytosinen mittels Hybridisierung unterscheiden lassen, mittels einer Multiplex-PCR erfolgt.

10

14. Verfahren oder Verwendung nach mindestens einem der Ansprüche 1-13, dadurch gekennzeichnet, dass als Standard eine Mischung aus methylierter und nicht-methylierter DNA verwendet wird.

15

15. Verfahren oder Verwendung nach mindestens einem der Ansprüche 1-14, dadurch gekennzeichnet, dass als Standard mehrere Gemische aus methylierter und nicht-methylierter DNA mit unterschiedlichen Anteilen an methylierter und nicht-methylierter DNA verwendet werden.

20

16. Verfahren oder Verwendung nach mindestens einem der Ansprüche 1-15, dadurch gekennzeichnet, dass die Methylierungsanalyse zur Diagnose von Krebserkrankungen oder anderen mit einer Veränderung des Methylierungsstatus assoziierten Krankheiten erfolgt.

25

17. Verfahren oder Verwendung nach mindestens einem der Ansprüche 1-16, dadurch gekennzeichnet, dass die Methylierungsanalyse zur Vorhersage von erwünschten oder unerwünschten Arzneimittelwirkungen und zur Unterscheidung

30

von Zelltypen oder Geweben, oder zur Untersuchung der Zelldifferenzierung erfolgt.

5 18. Verfahren zur Bestimmung von Methylierungsraten von DNA Proben mit Hilfe von Mikroarrays, welche CG und TG Oligomere enthalten, dadurch gekennzeichnet dass,  
die Arrays mit zwei Kalibrierungsstandards hybridisiert werden, die definierte Methylierungsraten aufweisen;  
10 sen;

anhand der erhaltenen Hybridisierungswerte mit Hilfe einer geeigneten Berechnungsmethode eine Kalibrierungskurve ermittelt wird, und

anhand dieser erstellten Kalibrierungskurve die tatsächlichen Methylierungsraten der untersuchten DNA Proben bestimmt werden.  
15

19. Verfahren nach Anspruch 18, dadurch gekennzeichnet, dass die zwei Kalibrierungsstandards Methylierungsraten von 0% und 100% aufweisen.  
20

20. Verfahren nach Anspruch 18, dadurch gekennzeichnet, dass mehr als zwei Kalibrierungsstandards verwendet werden, die unterschiedliche Methylierungsraten aufweisen.  
25

21. Verfahren nach Anspruch 18, dadurch gekennzeichnet, dass die tatsächlichen Methylierungsraten in einem mehrstufigen Berechnungsprozeß bestimmt werden, der dadurch gekennzeichnet ist, dass

30 a) eine Normalisierung der Hybridisierungswerte durchgeführt wird, wodurch Methylierungssignale ermittelt werden,

- b) eine Normalisierung der Signale mit dem Ziel einer Varianzstabilisierung durchgeführt wird,
- c) die Methylierungsraten unter Verwendung der Kalibrierungsstandards und eines geeigneten maximum-likelihood-algorithmus bestimmt werden.

5

22. Verfahren nach Anspruch 21, dadurch gekennzeichnet dass vor der Normalisierung der Hybridisierungswerte diese um das der Meßmethode inherente Hintergrundrauschen korrigiert werden.

10

18. Ein Kit, der aus Reagenzien zur Durchführung eines WGA-Verfahrens oder aus bereits über ein WGA-Verfahren amplifizierter DNA sowie aus Reagenzien zur Durchführung einer Bisulfitumwandlung besteht, und optional auch eine Polymerase, Primer und/oder Sonden für eine Amplifikation und Detektion enthält

20

19. Methylierte DNA, die über ein WGA-Verfahren hergestellt und anschließend mittels eines Enzyms methyliert wurde.

20. Methylierte DNA, die über ein WGA-Verfahren hergestellt und anschließend mittels der Sss1 Methylase methyliert wurde.

25

21. Gemisch aus methylierter und nicht-methylierter, über ein genomweites Amplifikationsverfahren hergestellter DNA.

30

22. Gemisch aus methylierter und nicht-methylierter, über ein genomweites Amplifikationsverfahren hergestellter DNA, bei dem der Anteil der methylierten DNA zwischen 5 und 95 % liegt.

5

23. Gemisch aus methylierter und nicht-methylierter, über ein genomweites Amplifikationsverfahren hergestellter DNA, bei dem der Anteil der methylierten DNA zwischen 10 und 80 % liegt.

10

24. Gemisch aus methylierter und nicht-methylierter, über ein genomweites Amplifikationsverfahren hergestellter DNA, bei dem der Anteil der methylierten DNA zwischen 25 und 75 % liegt.

15

25. Verwendung der DNA nach den Ansprüchen 19 bis 20 oder eines Gemisches nach einem der Ansprüche 21 bis 24 zur Methylierungsanalyse.

20

26. Verfahren oder Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 17, wobei die genomweite Amplifikation unter Einsatz ausschließlich von Nukleotiden bzw. Nukleotidtriphosphaten erfolgt, die nicht-methyliert sind.

25

27. Ein Kit, welches Reagenzien zur Durchführung eines WGA-Verfahrens unter Einsatz ausschließlich von nicht-methylierten Nukleotiden bzw. nicht-methylierten Nukleotidtriphosphaten, oder mittels eines unter Einsatz ausschließlich von nicht-methylierten Nukleotiden bzw. nicht-methylierten Nukleotidtriphosphaten durch ein WGA-Verfahren amplifizierte genomische DNA, Reagenzien zur Durchführung einer Bisulfitumwandlung, sowie, optional,

30

zumindest eine Polymerase und Primer für eine Amplifikation und/oder Sonden für eine Detektion enthält.

28. Isolierte methylierte DNA bzw. Mischung von isolierten methylierten DNA Fragmenten, dadurch erhältlich, dass genomische DNA mittels eines WGA-Verfahrens unter Einsatz ausschließlich von nicht-methylierten Nukleotiden bzw. Nukleotidtriphosphaten amplifiziert und die amplifizierte DNA bzw. die Mischung von amplifizierten DNA Fragmenten anschließend mittels eines Enzyms oder der Sss1 Methylase methyliert wird.

29. Gemisch enthaltend methylierte und nicht-methylierte DNA, vorzugsweise jeweils aus dem gleichen Organismus oder jeweils aus Organismen gleicher Spezies, wobei die nicht-methylierte DNA mittels eines WGA-Verfahrens unter Einsatz von nicht-methylierten Nukleotiden bzw. Nukleotidtriphosphaten erhalten wurde, wobei optional der Anteil methylierter DNA im Bereich zwischen 5 und 95 Mol-%, insbesondere zwischen 10 und 80 Mol-%, vorzugsweise zwischen 25 und 75 Mol-%, bezogen auf den Gesamtgehalt an DNA, liegt.



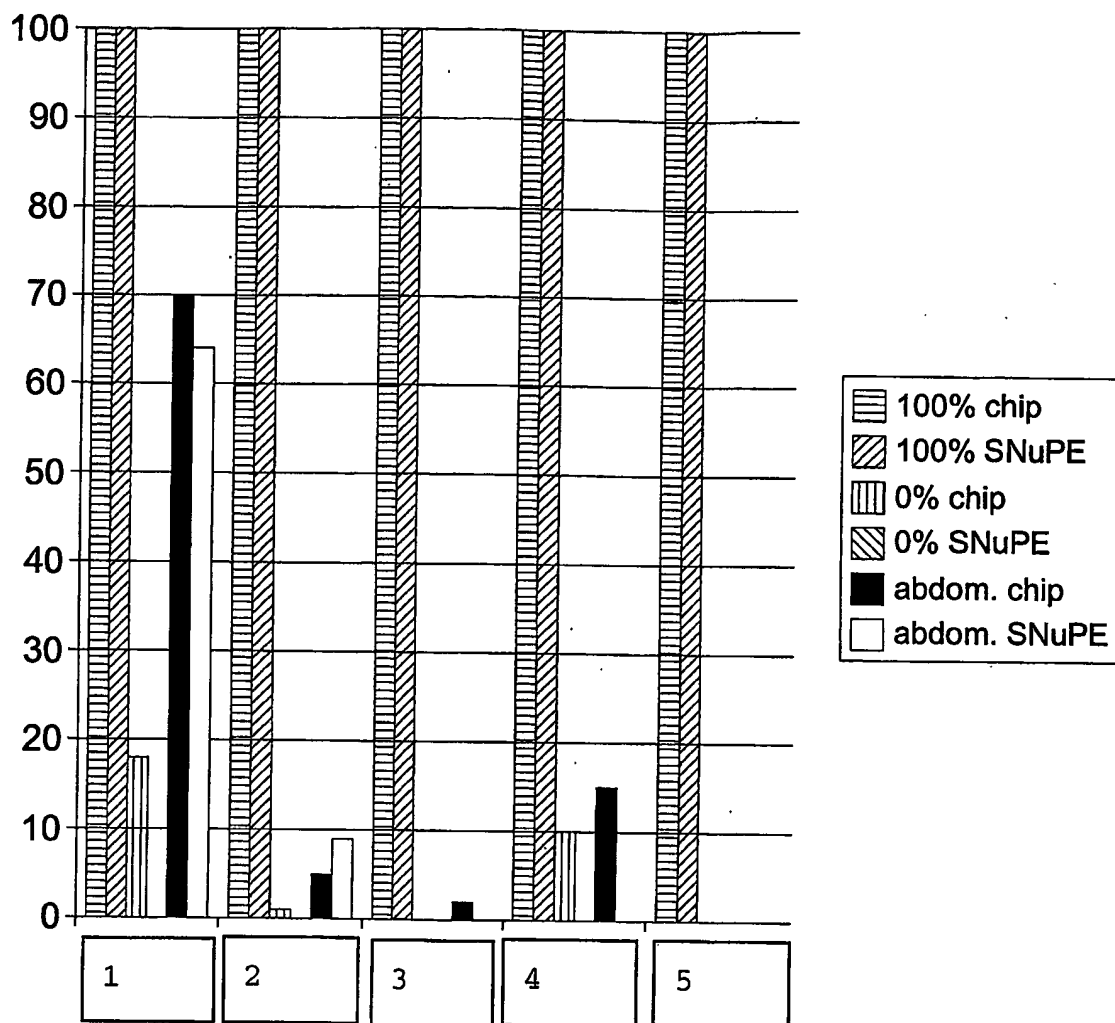


ABB. 1

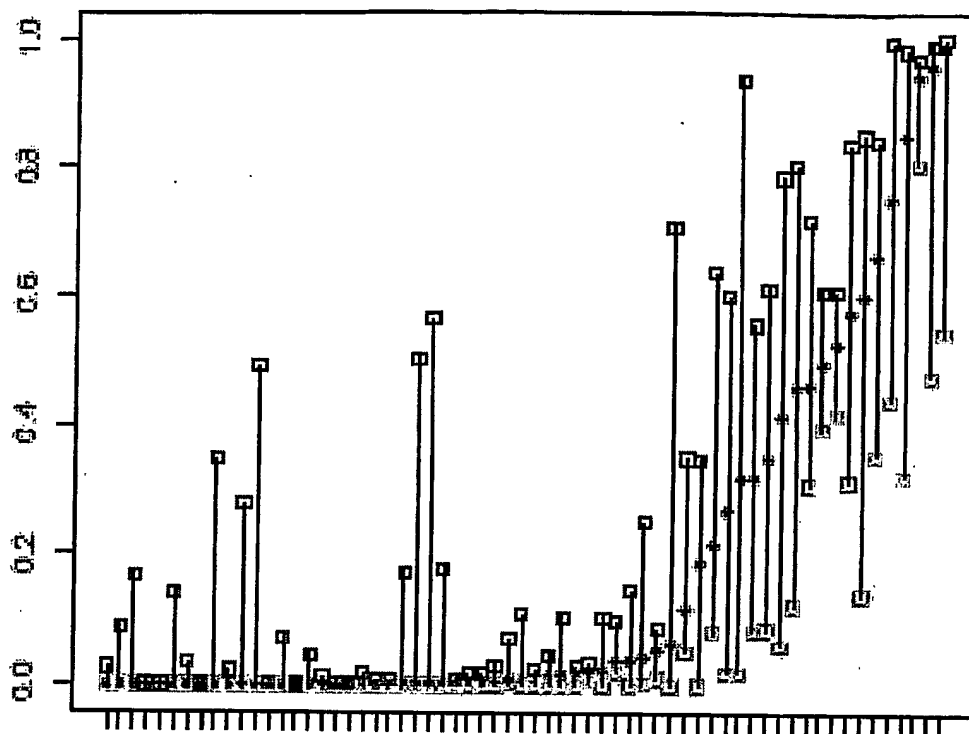


Abbildung 2

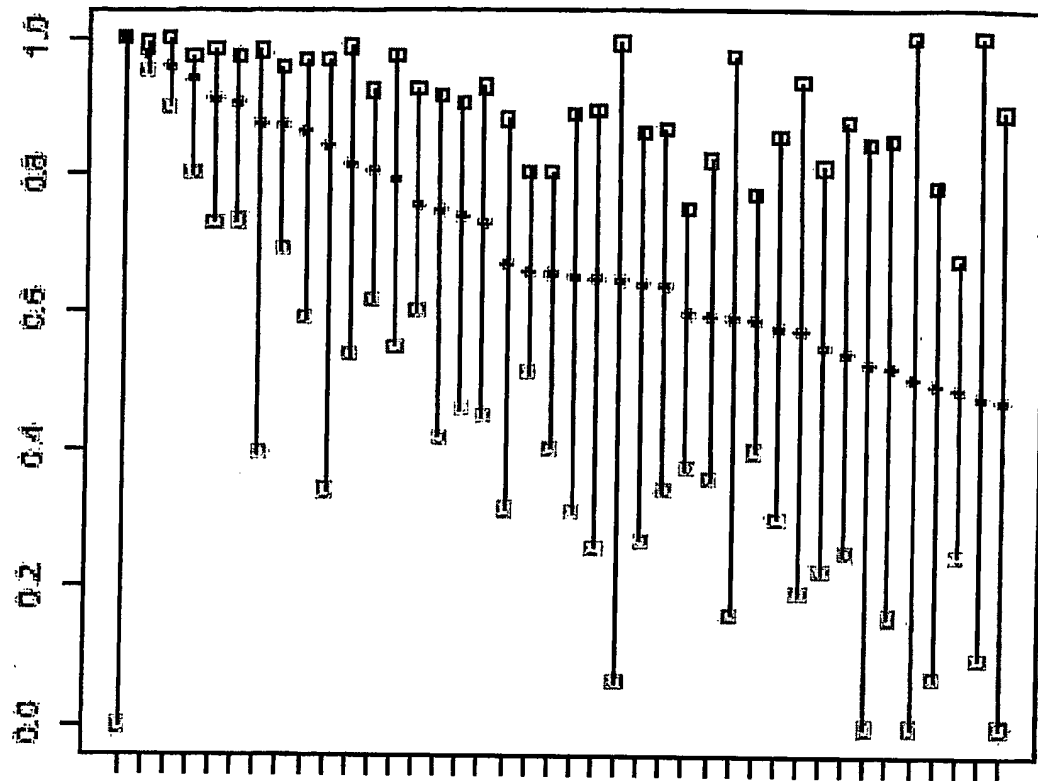


Abbildung 3

**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER**  
IPC 7 C12Q1/68

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

**B. FIELDS SEARCHED**

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)  
IPC 7 C12Q

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, WPI Data, PAJ, EMBASE, BIOSIS

**C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT**

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P, X	WO 2004/051224 A (ILLUMINA, INC; FAN, JIAN-BING) 17 June 2004 (2004-06-17) page 3 - page 6 page 12, paragraph 3 - page 13, paragraph 2 page 26 example 4	1-17, 23-34
X	US 2003/082600 A1 (OLEK ALEXANDER ET AL) 1 May 2003 (2003-05-01)  paragraphs '0078!, '0157!	18-22, 24, 25, 30, 33, 34
X	DE 101 12 515 A1 (EPIGENOMICS AG) 14 November 2002 (2002-11-14)	18-22, 24-34
Y	the whole document	1-17, 23
	-/--	

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

\* Special categories of cited documents:

- \*A\* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- \*E\* earlier document but published on or after the international filing date
- \*L\* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- \*O\* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- \*P\* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- \*T\* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- \*X\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- \*Y\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- \*Z\* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

4 July 2005

Date of mailing of the international search report

12/07/2005

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Bellmann, A

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 03/085132 A (EPIGENOMICS AG; BERLIN, KURT) 16 October 2003 (2003-10-16)  the whole document	18-22, 24,25, 30,33,34
X	WO 01/83796 A (UNIVERSITY OF WASHINGTON; LIEBER, ANDRE; STEINWAERDER, DIRK, S; CARLSO) 8 November 2001 (2001-11-08) page 50, paragraph 2	26-29
Y	DEAN F B ET AL: "Comprehensive human genome amplification using multiple displacement amplification" PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF USA, NATIONAL ACADEMY OF SCIENCE. WASHINGTON, US, vol. 99, no. 8, 16 April 2002 (2002-04-16), pages 5261-5266, XP002297504 ISSN: 0027-8424 the whole document	1-17,23
A	CHEUNG V G AND NELSON S F: "Whole genome amplification using a degenerate oligonucleotide primer allows hundreds of genotypes to be performed on less than one nanogram of genomic DNA" PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF USA, NATIONAL ACADEMY OF SCIENCE. WASHINGTON, US, vol. 93, December 1996 (1996-12), pages 14676-14679, XP002126260 ISSN: 0027-8424 the whole document	
A	TELENIUS H ET AL: "DEGENERATE OLIGONUCLEOTIDE-PRIMED PCR: GENERAL AMPLIFICATION OF TARGET DNA BY A SINGLE DEGENERATE PRIMER" GENOMICS, ACADEMIC PRESS, SAN DIEGO, US, vol. 13, 1992, pages 718-725, XP000199116 ISSN: 0888-7543 the whole document	
A	ZHANG L ET AL: "Whole genome amplification from single cell: Implications for genetic analysis" PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF USA, NATIONAL ACADEMY OF SCIENCE. WASHINGTON, US, vol. 89, July 1992 (1992-07), pages 5847-5851, XP002130909 ISSN: 0027-8424 the whole document	

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2004051224 A	17-06-2004	US 2003170684 A1 AU 2003297654 A1 WO 2004051224 A2	11-09-2003 23-06-2004 17-06-2004
US 2003082600 A1	01-05-2003	DE 10112515 A1 DE 10158283 A1 CA 2435917 A1 CN 1539023 A WO 02072880 A2 EP 1370691 A2 JP 2004527241 T	14-11-2002 28-05-2003 19-09-2002 20-10-2004 19-09-2002 17-12-2003 09-09-2004
DE 10112515 A1	14-11-2002	CA 2435917 A1 CN 1539023 A WO 02072880 A2 EP 1370691 A2 JP 2004527241 T US 2003082600 A1	19-09-2002 20-10-2004 19-09-2002 17-12-2003 09-09-2004 01-05-2003
WO 03085132 A	16-10-2003	AU 2003223041 A1 WO 03085132 A2	20-10-2003 16-10-2003
WO 0183796 A	08-11-2001	AU 5753201 A WO 0183796 A2 US 2002037280 A1	12-11-2001 08-11-2001 28-03-2002

<b>A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES</b> IPK 7 C12Q1/68		
Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK		
<b>B. RECHERCHIERTE GEBIETE</b> Recherchierte Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole) IPK 7 C12Q		
Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen		
Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe) EPO-Internal, WPI Data, PAJ, EMBASE, BIOSIS		
<b>C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN</b>		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
P, X	WO 2004/051224 A (ILLUMINA, INC; FAN, JIAN-BING) 17. Juni 2004 (2004-06-17) Seite 3 - Seite 6 Seite 12, Absatz 3 - Seite 13, Absatz 2 Seite 26 Beispiel 4	1-17, 23-34
X	----- US 2003/082600 A1 (OLEK ALEXANDER ET AL) 1. Mai 2003 (2003-05-01)  Absätze '0078!, '0157!	18-22, 24, 25, 30, 33, 34
X	----- DE 101 12 515 A1 (EPIGENOMICS AG) 14. November 2002 (2002-11-14)	18-22, 24-34
Y	----- das ganze Dokument	1-17, 23
-/-		
<div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <span><input checked="" type="checkbox"/> Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen</span> <span><input checked="" type="checkbox"/> Siehe Anhang Patentfamilie</span> </div>		
<div style="display: flex;"> <div style="flex: 1;"> <p>* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :</p> <p>*A* Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist</p> <p>*E* älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist</p> <p>*L* Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)</p> <p>*O* Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht</p> <p>*P* Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist</p> </div> <div style="flex: 1;"> <p>*T* Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist</p> <p>*X* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden</p> <p>*Y* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist</p> <p>*g* Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist</p> </div> </div>		
Datum des Abschlusses der internationalen Recherche		Absendedatum des internationalen Recherchenberichts
4. Juli 2005		12/07/2005
Name und Postanschrift der internationalen Recherchenbehörde Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Bevollmächtigter Bediensteter  Bellmann, A

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	WO 03/085132 A (EPIGENOMICS AG; BERLIN, KURT) 16. Oktober 2003 (2003-10-16)  das ganze Dokument	18-22, 24,25, 30,33,34
X	WO 01/83796 A (UNIVERSITY OF WASHINGTON; LIEBER, ANDRE; STEINWAERDER, DIRK, S; CARLSO) 8. November 2001 (2001-11-08) Seite 50, Absatz 2	26-29
Y	DEAN F B ET AL: "Comprehensive human genome amplification using multiple displacement amplification" PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF USA, NATIONAL ACADEMY OF SCIENCE. WASHINGTON, US, Bd. 99, Nr. 8, 16. April 2002 (2002-04-16), Seiten 5261-5266, XP002297504 ISSN: 0027-8424 das ganze Dokument	1-17,23
A	CHEUNG V G AND NELSON S F: "Whole genome amplification using a degenerate oligonucleotide primer allows hundreds of genotypes to be performed on less than one nanogram of genomic DNA" PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF USA, NATIONAL ACADEMY OF SCIENCE. WASHINGTON, US, Bd. 93, Dezember 1996 (1996-12), Seiten 14676-14679, XP002126260 ISSN: 0027-8424 das ganze Dokument	
A	TELENIUS H ET AL: "DEGENERATE OLIGONUCLEOTIDE-PRIMED PCR: GENERAL AMPLIFICATION OF TARGET DNA BY A SINGLE DEGENERATE PRIMER" GENOMICS, ACADEMIC PRESS, SAN DIEGO, US, Bd. 13, 1992, Seiten 718-725, XP000199116 ISSN: 0888-7543 das ganze Dokument	
A	ZHANG L ET AL: "Whole genome amplification from single cell: Implications for genetic analysis" PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF USA, NATIONAL ACADEMY OF SCIENCE. WASHINGTON, US, Bd. 89, Juli 1992 (1992-07), Seiten 5847-5851, XP002130909 ISSN: 0027-8424 das ganze Dokument	



Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
WO 2004051224 A	17-06-2004	US 2003170684 A1	11-09-2003
		AU 2003297654 A1	23-06-2004
		WO 2004051224 A2	17-06-2004
US 2003082600 A1	01-05-2003	DE 10112515 A1	14-11-2002
		DE 10158283 A1	28-05-2003
		CA 2435917 A1	19-09-2002
		CN 1539023 A	20-10-2004
		WO 02072880 A2	19-09-2002
		EP 1370691 A2	17-12-2003
		JP 2004527241 T	09-09-2004
DE 10112515 A1	14-11-2002	CA 2435917 A1	19-09-2002
		CN 1539023 A	20-10-2004
		WO 02072880 A2	19-09-2002
		EP 1370691 A2	17-12-2003
		JP 2004527241 T	09-09-2004
		US 2003082600 A1	01-05-2003
WO 03085132 A	16-10-2003	AU 2003223041 A1	20-10-2003
		WO 03085132 A2	16-10-2003
WO 0183796 A	08-11-2001	AU 5753201 A	12-11-2001
		WO 0183796 A2	08-11-2001
		US 2002037280 A1	28-03-2002